

Merz, Roland

Diss. Mainz

1986

Aus der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Leiter: Prof. Dr. Dr. K.H. Meyer zum Büschenfelde)

Entwicklung eines Enzymimmunoassays zur Untersuchung von
antimitochondrialen Antikörpern der Immunglobulinklasse IgM
in Seren von Patienten mit primär biliärer Zirrhose

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
dem Fachbereich Medizin vorgelegt

von Ronald Merz
aus Koblenz

Mainz 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555001_0037

Dekan: Prof. Dr. J. Michaelis

1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. M. Manns

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. K.H. Meyer zum Büschenfelde

Tag der Promotlon: 14.10.1986

1. Einleitung

2. Material und Methoden

2.1. Patientenpopulation

2.2. Studiendesign

2.3. Endpunkte und Ziele

2.4. Statistische Analyse

2.5. Beschreibung der Patientenpopulation

2.5.1. Baselinecharakteristika

2.5.2. Regionale Unterschiede

2.5.3. Dritt-Einstufung

2.6. Population von Malignomen

2.7. Population der 20-Jährigen (mit 100-Jährigen)

2.7.1. Patientencharakteristika

2.8. Population der 20-Jährigen (mit 100-Jährigen)

2.8.1. Patientencharakteristika

2.9. Ergebnisse der Analyse der Patientenpopulation

2.9.1. Ergebnisse

2.9.2. Ergebnisse

2.9.3. Ergebnisse

2.9.4. Ergebnisse

2.9.5. Ergebnisse

2.10. Ergebnisse der Analyse der Patientenpopulation

2.10.1. Ergebnisse

2.10.2. Ergebnisse

2.10.3. Ergebnisse

2.10.4. Ergebnisse

2.11. Ergebnisse der Analyse der Patientenpopulation

2.11.1. Ergebnisse

2.11.2. Ergebnisse

2.11.3. Ergebnisse

2.11.4. Ergebnisse

2.11.5. Ergebnisse

2.11.6. Ergebnisse

2.11.7. Ergebnisse

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<u>1. Einleitung</u>	1
<u>2. Material und Methoden</u>	
2.1 Patientenkollektiv	5
2.2 Normalkollektiv	5
2.3 Serologische Tests	5
2.4 Proteinbestimmung	5
2.5 Bestimmung der Immunglobulinklassen	
2.5.1 Lasernephelometrie	6
2.5.2 radiale Immundiffusion	6
2.5.3 Enzymimmunoassay	6
2.6 Präparation von Mitochondrien	7
2.7 Präparation der IgG-Fraktion eines AMA-positiven Referenzserums	7
2.8 Peroxidasekopplung der IgG-Fraktion eines Referenzserums	8
2.9 Enzymimmunoassay zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens	9
2.9.1 Testsystem	9
2.9.2 Optimierungsversuche	10
2.9.3 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testsystems	20
2.10 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen	
2.10.1 Testsystem	20
2.10.2 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testsystems	21
2.11 Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen in der IgM-Fraktion von Patientenseren	21
2.11.1 Enzymimmunoassays zum direkten Nachweis IgM- spezifischer antimitochondrialer Antikörper in Patientenseren	21
2.11.2 Nachweis antimitochondrialer Antikörper in der gereinigten IgM-Fraktion von Patientenseren	23

3. Ergebnisse

- 3.1 Untersuchungen zur Organ- und Spezies-Spezifität des mitochondrialen M 2-Antigens 26
- 3.2 Inzidenz der Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen in Patientenseren, bestimmt mittels Enzymimmunoassay 35
- 3.3 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Testsysteme
 - 3.3.1 Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens 40
 - 3.3.2 Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen 41
- 3.4 Nachweis von Antikörpern gegen das M 2-Antigen in der Immunglobulinklasse M 42

4. Diskussion 51

5. Zusammenfassung 56

6. Abkürzungsverzeichnis 57

7. Literaturverzeichnis 59

1. EINLEITUNG

Bei der primär biliären Zirrhose (PBC) handelt es sich um eine Erkrankung, deren Ätiologie noch ungeklärt ist. Sie tritt vorwiegend beim weiblichen Geschlecht auf, in einer Altersgruppe zwischen vierzig und sechzig Jahren (Sherlock et al. 1973, Christensen et al. 1980). Häufig liegt auch eine Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen vor, wie Sklerodermie, Sjögren-Syndrom, Raynaud-Phänomen, rheumatoider Arthritis, CREST-Syndrom, Interstitieller Pneumonie, Lupus erythematoses disseminatus, Thyreoiditis und Sicca-Syndrom (Klatskin et al. 1972, Sherlock et al. 1973, Bodenheimer et al. 1979, Christensen et al. 1980, Lee et al. 1981). Es werden auch Autoantikörper nachgewiesen gegen glatte Muskulatur (SMA), gegen Kerne (ANA) sowie gegen Mitochondrien (AMA).

Zu den häufigsten klinischen Symptomen gehören: Juckreiz, Ikterus, Hepatosplenomegalie und Symptome als Folge einer eingetretenen Zirrhose, wie gastrointestinale Blutungen und Aszites sowie unspezifische Symptome wie Müdigkeit und Schmerzen im rechten Oberbauch (Sherlock et al. 1973, Christensen et al. 1980, Roll et al. 1983). Von prognostischer Bedeutung sind nach Christensen et al. 1980 und Roll et al. 1983 das Alter des Patienten, das histologische Stadium, die Höhe des Serumbilirubinspiegels sowie das Ausmaß der Hepatosplenomegalie.

Histologisch werden bei der primär biliären Zirrhose vier Stadien unterschieden (Scheuer 1967, Sherlock et al. 1973):

Im Stadium I zeigt sich eine floride Schädigung der interlobulären Gallengänge. Diese Frühform der PBC wird auch als chronisch destruerende, nicht eitrige Cholangitis bezeichnet. In diesem Stadium werden häufig Granulome in der Leberbiopsie festgestellt, sie sind ein wichtiges Kriterium der Frühform der PBC. Lee et al. 1981 messen ihnen eine prognostische Bedeutung zu. Die Erkennung der Frühform der PBC gestaltet sich oft schwierig, da sie sich wegen des fokalen Auftretens bei einer Leberbiopsie häufig dem histologischen Nachweis entziehen kann (Sherlock et al. 1973).

Im Stadium II liegt eine Proliferation der Ductuli, Fibrose sowie eine akute oder chronische entzündliche Infiltration des periportal Leberparenchyms vor, während im Stadium III die Entzündung zurückgeht, sich die Fibrose aber auch auf die Lobuli erstreckt. Außerdem treten Zeichen der Cholestase hinzu. Das Stadium IV stellt die Endstufe dieser Lebererkrankung dar, die eigentliche primär biliäre Zirrhose.

Histologisch fällt in den Stadien III und IV besonders die Abgrenzung zur chronisch aktiven Hepatitis (CAH) schwer, da histologische Veränderungen im Sinne der CAH durchaus zur morphologischen Diagnose der PBC gehören, was besonders die Piecemeal-Nekrosen betrifft. Auch eine Mischform der PBC und der CAH wird diskutiert (Berg et al. 1975).

Als diagnostische Leitsymptome der PBC gelten die Erhöhung der alkalischen Phosphatase (AP), die Erhöhung der IgM-Immunglobuline sowie der Nachweis von antimitochondrialen Antikörpern (AMA).

Der Nachweis von AMA hat in den letzten Jahren für die Diagnose der PBC an Bedeutung gewonnen. Hierdurch wurde auch ein großer Teil nicht symptomatischer PBC-Patienten entdeckt (James et al. 1981). Sie werden mit dem Immunfluoreszenztest (IFT) bei über 90% der PBC-Patienten nachgewiesen.

Verschiedene Subtypen antimitochondrialer Antikörper sind bekannt, die gegen verschiedene mitochondriale Antigene gerichtet sind. Diese sind mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, wie aus der Tabelle 1.1 hervorgeht.

Tabelle 1.1 Heterogenität antimitochondrialer Antikörper
(nach Meek et al. 1980, Berg 1982a und Berg et al. 1986)

	Antigen	Assoziierte Erkrankung
M 1	Cardiolipin	Lues II
M 2	Trypsin-sensitives Antigen der inneren Mitochondrienmembran, ATP-ase assoziiert	Primär biliäre Zirrhose
M 3	Trypsin-Insensitives Antigen der der äußeren Mitochondrienmembran	Pseudo-Lupus erythematodes-Syndrom
M 4	Äußere Membran, Trypsin-Insensitiv, Digitonin-Insensitiv	Cholestatische CAH
M 5	Äußere Membran, Trypsin-Insensitiv, Digitonin-sensitiv	Kollagenkrankheiten, autoimmune haemolytische Anämie
M 6	Äußere Membran, Trypsin-Insensitiv	Iproniazid-Induzierte Hepatitis
M 7	Innere Membran, Trypsin-sensitiv	Kardiomyopathie, Myokarditis
M 8	Äußere Membran, Trypsin-sensitiv	Primär biliäre Zirrhose
M 9	Äußere Membran, Trypsin-Insensitiv	Primär biliäre Zirrhose

Die verschiedenen Subtypen können mit dem herkömmlichen IFT nicht differenziert werden. Daher sind zur Differenzierung spezifischere serologische Nachweisverfahren erforderlich. Bei der PBC treten AMA gegen das Trypsin-sensitive, ATP-ase assoziierte Antigen der Inneren Mitochondrienmembran, das M 2-Antigen, auf (AMA-M 2). (Berg et al. 1967, Berg et al. 1969a, Manns et al. 1982).

Ein spezifischer Nachweis der AMA-M 2 ist in der Komplement-Bindungsreaktion von Berg et al. 1967, Im Radioimmunoassay (RIA) von Manns et al. 1982, in einem von Berg et al. 1982b beschriebenen fluorometrischen Immunoassay (FIAX) sowie in dem von Nagai et al. 1983 beschriebenen Enzymimmunoassay (ELISA) entwickelt worden.

Die pathogenetische Bedeutung der organ- und speziesunspezifischen AMA-M 2 ist nicht erwiesen, Roll et al. 1983 konnten keine Korrelation zwischen der Überlebensrate von PBC-Patienten und dem Nachweis von AMA finden, ebenso wenig eine Korrelation mit den AMA-Titern.

Klatskin et al. 1972 konnten keine Beziehung zwischen dem Vorhandensein von AMA und der Dauer der Symptome bei der PBC finden, woraus sie schlossen, daß AMA früh bei der Entwicklung der PBC entstehen und persistieren.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Diagnose der PBC ist der hohe Spiegel an Immunglobulinen der IgM-Klasse. Auch hier ist die Bedeutung in ätiologischer u. pathogenetischer Hinsicht nicht geklärt. Lindgren et al. 1982 konnten keine abnormen IgM-Populationen bei PBC-Patienten nachweisen. Allerdings wurde beschrieben, daß sich das IgM von PBC-Patienten wie ein Immunkomplex verhält, z.B. in Bezug auf die Komplementaktivierung oder Kryopräzipitation. IgM-Moleküle von PBC-Patienten haben aber dieselbe Molekülgröße und elektrophoretischen Eigenschaften wie IgM von Normalpersonen. Ein spezifisches Antigen, welches an IgM-Moleküle von PBC-Patienten gebunden wäre, konnte von Lindgren et al. 1982 nicht nachgewiesen werden.

Von Fakunle et al. 1979 wurden bei Patienten mit PBC oder CAH im Vergleich zu Normalpersonen erhöhte Konzentrationen von monomerem (7S) IgM beschrieben. Die Antigenspezifität dieses monomeren IgM ist unbekannt.

Fakunle et al. 1979 diskutierten eine gestörte IgM-Biosynthese; da dieses monomere IgM nur bei Patienten mit erhöhter IgM-Konzentration vorkommt, wurde eine unvollständige Polymerisation aufgrund der erhöhten Syntheseleistung angenommen. Da monomeres IgM auch bei parasitären Erkrankungen festgestellt wurde, was einem starken antigenen oder mitogenen Stimulus zugeschrieben wurde, der auch die erhöhte IgM-Synthese bewirkt, wurde ein

ähnlicher mitogener oder antigener Stimulus bei der PBC für möglich gehalten. Lindgren et al. 1982 konnten allerdings dieses 7S-IgM bei PBC-Patienten nicht nachweisen.

James et al. 1981 konnten keine Korrelation zwischen der gemessenen IgM-Konzentration im Serum von PBC-Patienten und der Progression der Erkrankung feststellen.

Riggione et al. 1983 beschrieben bei der Untersuchung von AMA aus Seren von PBC-Patienten, daß diese weitgehend der IgG-Klasse angehörten, aber auch in der IgM-Klasse vorkamen. Außerdem beschrieben sie, daß diese AMA überwiegend der IgG-Subklasse IgG-3 angehören. Dies wurde bisher für Autoantikörper nicht beschrieben, ist jedoch bei bestimmten Virus-erkrankungen beobachtet worden. Somit erscheint auch ein Virus als ätiologisches Agens bei der PBC möglich.

In dieser Arbeit sollte versucht werden, ein Testsystem aufzubauen, mit dem antimitochondriale Antikörper der IgM-Klasse gegen das mitochondriale M 2-Antigen nachgewiesen werden können. Es sollte untersucht werden, ob IgM-Antikörper mit Spezifität für das M 2-Antigen einen bedeutenden Anteil der erhöhten IgM-Immunglobuline bei der PBC darstellen bzw. mit klinischen und laborchemischen Parametern der PBC korrelieren.

Es wurde der von Nagai et al. 1983 beschriebene Enzymimmunoassay weiter optimiert und zur Untersuchung der Organ- und Spezies-Spezifität des M 2-Antigens eingesetzt.

Verschiedene Testsysteme wurden entwickelt und untersucht zum Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das PBC assoziierte M 2-Antigen der inneren Mitochondrienmembran.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientenkollektiv

Es wurden Seren von 259 Patienten untersucht, die sich wie folgt aufgliederten:

58 Patienten mit primär biliärer Zirrhose, 51 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis, davon waren 21 HBsAg-positiv, 17 Patienten mit akuten Virushepatitiden, 22 Patienten mit Leberzirrhose, 29 Patienten mit verschiedenen anderen Lebererkrankungen sowie 82 Patienten mit nichthepatischen Erkrankungen. Alle gewonnenen Serumproben wurden bei 56°C inaktiviert und bei -20°C gelagert.

2.2 Normalkollektiv

Seren von 106 gesunden Kontrollpersonen (68 männlich, 38 weiblich) im Alter zwischen 15 und 73 Jahren wurden untersucht. In diesen Seren waren keine Autoantikörper und keine Antikörper gegen das Hepatitis A oder B-Virus nachweisbar. Die Serumproben wurden behandelt wie in 2.1 beschrieben.

2.3 Serologische Tests

Alle Seren wurden auf folgende Autoantikörper getestet:

Antikörper gegen Zellkernantigene (ANA) im Immunfluoreszenztest (IFT), Antikörper gegen glatte Muskulatur (SMA) im IFT, Antikörper gegen Mitochondrien (AMA) im IFT, Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen im RIA (Manns et al. 1982), Rheumafaktor im Latextest (Behringwerke, Marburg), Antikörper gegen Thyreoglobulin (TAK) und gegen Schilddrüsenmikrosomen (MAK) in der passiven Hämagglutination (Mastdiagnostika, Hamburg).

Weiterhin wurden folgende Bestimmungen der Hepatitisserologie durchgeführt: Hepatitis B-Oberflächen-Antigen (HBsAg), Antikörper gegen das HBsAg (Anti-HBs), gegen das Hepatitis B-core-antigen (Anti-HBc) und gegen das Hepatitis A-Virus (Anti-HAV).

2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden nach Lowry et al. 1951 bestimmt.

2.5 Bestimmung der Immunglobulinklassen

2.5.1 Lasernephelometrie

Die quantitative Bestimmung der Immunglobulinklassen in Patientenserum wurde mittels Lasernephelometrie durchgeführt (Zentrallabor der Universitätskliniken Mainz, Leiter Prof.Dr. W. Prellwitz)

2.5.2 Radiale Immundiffusion

Für die quantitative Bestimmung der Immunglobulinklasse in durch Gelfiltration aufgetrennten Serumfraktionen wurden die für die radiale Immundiffusion nach Mancini kommerziell erhältlichen Partigen-Platten (Behringwerke, Marburg) verwendet. Für höhere Konzentrationen wurden Tri-Partigen-, für niedrige Konzentrationsbereiche LC-Partigen-Platten angewendet. Die Platten wurden nach den Anweisungen des Herstellers benutzt.

2.5.3 Enzymimmunoassay

Zur semiquantitativen Bestimmung der Immunglobulinklassen wurde folgender Enzymimmunoassay entwickelt:

a) Je 50 µl der zu untersuchenden Proben wurden drei Stunden bei Raumtemperatur in Dynatech-Mikroelisa-Testplatten inkubiert. Anschließend wurde einmal mit PBS gewaschen, worauf eine Nachbeschichtung mit 300 µl 0,05% Tween-PBS für eine Stunde folgte; anschließend wurde dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.

b) Immunglobulinklassenspezifisches Antikörper-Peroxidase-Konjugat (Ziege-Anti-Human IgG, IgM, IgA; Sigma, München), in einer Verdünnung von 1:500 in 1% BSA-PBS, je 50 µl pro Vertiefung, wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.

c) Als Substrat wurde 50 mM 2,2'-Azino-bis(3-äthyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)-(NH₄)₂-Salz (ABTS; Serva, Heidelberg) mit 0,0025% H₂O₂ verwendet. Je 20 µl pro Vertiefung wurden 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die Farbreaktion gestoppt und die Extinktion bei 414 nm gemessen.

2.6 Präparation von Mitochondrien

Die Mitochondrien wurden gereinigt nach Berg et al. 1967. Die Mitochondrien wurden aus verschiedenen Organen unterschiedlicher Spezies präpariert:

a) Meerschweinchen:

Leber, Niere, Lunge, Magen, Dünndarm, Kolon, Skelettmuskel

b) Kaninchen:

Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz, Pankreas, Magen, Dünndarm, Kolon, Schilddrüse, Hirn, Kleinhirn, Skelettmuskel

c) Maus:

Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz, Pankreas, Magen, Dünndarm, Kolon, Schilddrüse, Hirn, Skelettmuskel

d) Ratte:

Leber, Milz, Niere, Lunge, Herz, Pankreas, Ösophagus, Magen, Dünndarm, Kolon, Hoden, Nebenhoden, Prostata, Schilddrüse, Hirn, Kleinhirn, Skelettmuskel

e) Mensch:

Leber

Als Standardantigen zur Optimierung des Enzymimmunoassays zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens wurde mitochondriales Antigen aus Rattenleber (RLMI) verwendet.

Nach der Präparation wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt und die präparierten Mitochondrien anschließend bei -20°C gelagert.

2.7 Präparation der IgG-Fraktion eines AMA-positiven Referenzserums

Als Referenzserum wurde ein Patientenserum ausgewählt, welches sowohl im IFT für AMA als auch im RIA für AMA-M 2 positiv reagierte, hingegen negativ im Bezug auf andere Autoantikörper (siehe Tabelle 3.2.2, Serum Nr. 24).

10 ml dieses Serums wurden auf eine Sephadex G 50-fine Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Freiburg) aufgetragen (Volumen 196 ml, Höhe 40 cm, Elutionspuffer 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,5). Das gewonnene Eluat wurde auf eine DE-52-Cellulose-Säule (Whatman, England) gegeben (Volumen 200 ml, Elutionspuffer wie oben). Das hierbei gewonnene Eluat wurde in Fraktionen von 5 ml aufgefangen, dabei wurde als Maß für den Proteingehalt die Transmission bei 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet. Eluierte Proteingipfel wurden gepoolt. Der Immunglobulingehalt der gepoolten Eluate wurde mittels radialer Immundiffusion nach Mancini bestimmt. Es konnte nur

IgG, nicht aber IgM oder IgA nachgewiesen werden. Das hier gewonnene IgG wurde portioniert und bei -80°C aufbewahrt.

2.8 Peroxidasekopplung der IgG-Fraktion eines Referenzserums

Die Peroxidasekopplung wurde modifiziert nach Mathiesen et al. 1978 durchgeführt. 8 mg Meerrettich-Peroxidase (horse-radish peroxidase, HRPO; Sigma, München) wurden mit der Perjodat-Methode an 15 mg Referenz-IgG gekoppelt. Das Gemisch von IgG-Peroxidase-Konjugat, freier Peroxidase und freiem IgG wurde über eine Sephacryl S-200 Superfine Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Freiburg) aufgetrennt (Flußrate 40 ml/h, Höhe 30 cm, Volumen 147 ml). Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 ml aufgefangen. Gleichzeitig wurde die Transmission bei 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet. Von den Fraktionen der hierbei erhaltenen Gipfel wurden einzeln die Extinktionen bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt und bei 403 nm als Maß für den Peroxidasegehalt gemessen. Ein Beispiel für eine hierbei erhaltene Kurve zeigt die Abbildung 2.8.1.

Die das IgG-Peroxidase-Konjugat enthaltenden Fraktionen des ersten Gipfels (Abb. 2.8.1, Nr. 32-45) wurden gepoolt, anschließend wurden bei dem erhaltenen Pool ebenfalls die Extinktionen bei 280 und 403 nm bestimmt. Aus den erhaltenen Werten wurde der Gehalt an IgG im Konjugat errechnet. Das Konjugat wurde eingeeengt und auf eine Konzentration von 1 mg IgG/ ml Konjugat eingestellt. Anschließend wurde zur Stabilisierung Rinderserumalbumin (BSA) bis zu einer endgültigen Konzentration von 10 mg Protein/ ml hinzugegeben. Das Konjugat wurde portioniert und bei -80°C gelagert.

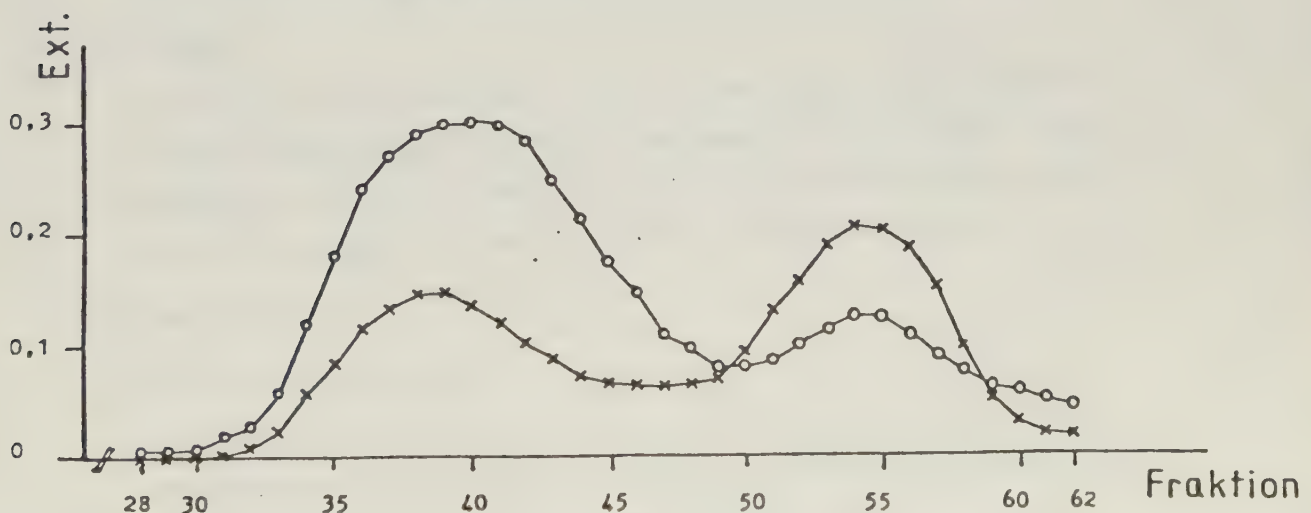


Abb. 2.8.1 Peroxidasekopplung eines Referenz-IgG. Untersuchung der durch Sephacryl S-200 Gelfiltration gewonnenen Fraktionen des Kopplungsgemisches

o--o Extinktion bei 280 nm (Proteinkonzentration)
 x--x Extinktion bei 403 nm (Peroxidasekonzentration)

2.9 Enzymimmunoassay zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens

Ausgehend von dem durch Nagai et al. 1983 beschriebenen Enzymimmunoassay wurden zu den einzelnen Testschritten Optimierungsversuche durchgeführt, die zu dem im folgenden beschriebenen Test führten.

2.9.1 Testsystem

a) Beschichten der Platte mit dem Referenz-IgG

Dynatech Mikroelisaplaten (M 129 A, Dynatech, Plochingen) wurden mit je 50 µl des Referenz-IgG (0,1 mg/ ml, verdünnt in PBS) pro Vertiefung gefüllt. Alle Proben wurden jeweils zweifach bestimmt. Die Platte wurde für drei Stunden bei 4°C inkubiert.

b) Waschen der Platte

Die Platte wurde einmal mit PBS gewaschen.

c) Nachbeschichten

Um die unspezifische Bindung von Proteinen an die Wand der Platte zu verringern, wurde sie mit 0,05% Tween-PBS, 300µl pro Vertiefung, gefüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

d) Waschen

Bei den folgenden Waschschritten wurde 0,05% Tween-PBS benutzt, es wurde jeweils dreimal gewaschen.

e) Antigen

Je 50 µl der Antigenpräparation, die zehn Sekunden mit Ultraschall behandelt wurde (Braun Sonic 125 Homogenisator bei 20 kHz), wurden eingefüllt. Als Negativkontrolle wurde an Stelle des Antigens die gleiche Menge PBS benutzt. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

f) Waschen

g) IgG-Peroxidase-Konjugat

Pro Testansatz wurden 50 µl des Antikörper-Peroxidase-Konjugates (Konzentration 12,5 µg IgG/ml, verdünnt in 5% BSA-PBS) eingefüllt, die Platte wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

h) Waschen

i) Substrat

50 mM ABTS mit 0,0025% H_2O_2 in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,0, wurde als Substrat verwendet. Es wurden 20 μ l pro Testansatz eingefüllt, die Platte wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

j) Stoppen der Farbreaktion

Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von je 300 μ l 2mM Natriumacid in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 6,0 gestoppt.

k) Messung der Extinktion

Die Extinktionswerte wurden anschließend bei 414 nm gemessen, davon wurde automatisch die Extinktion bei 492 nm subtrahiert, wodurch Plattenfehler ausgeglichen wurden. Zur Messung wurde das Achtkanalphotometer Titertek Multiscan MC (Flow, Meckenheim) benutzt. Gemessen wurde gegen Stopplösung als Leerwert, außerdem wurde noch die Extinktion der Substratlösung bestimmt.

2.9.2 Optimierungsversuche

Folgende Optimierungsversuche haben zu dem 2.9.1 beschriebenen Enzym-immunoassay geführt:

2.9.2.1 Beladung der Testplatte mit Antikörpern

a) Wahl geeigneter Testplatten

Es wurden Mikrotiterplatten verschiedener Hersteller getestet:

- * Dynatech Flat Bottom Microelisa Plates Immulon M 129 A (Dynatech, Plochingen)
- * Linbro E.I.A. Microtitration Plate, Linbro Division (Flow, Meckenheim)
- * Titertek Immuno-Assay-Plate, Polyvinylchlorid (PVC) (Flow, Meckenheim)

Alle Platten verfügten über 96 (12x8) Vertiefungen mit Flachböden und konnten mit dem Achtkanalphotometer Titertek Multiscan MC ausgewertet werden.

Es wurde kein Unterschied bei den Extinktionswerten zwischen den verschiedenen Platten festgestellt, ein Beispiel ist in Abb. 2.9.1 dargestellt. Die Titertek Platte war jedoch schlechter als die anderen Platten zu handhaben, da sie flexibler war. Außerdem hatten die Vertiefungen der Titertek Platte ein geringeres Volumen, so daß dort nur je 200 μ l Waschpuffer bzw. Stopplösung verwendet werden konnten. Für weitere Untersuchungen wurde die Dynatech Platte benutzt.

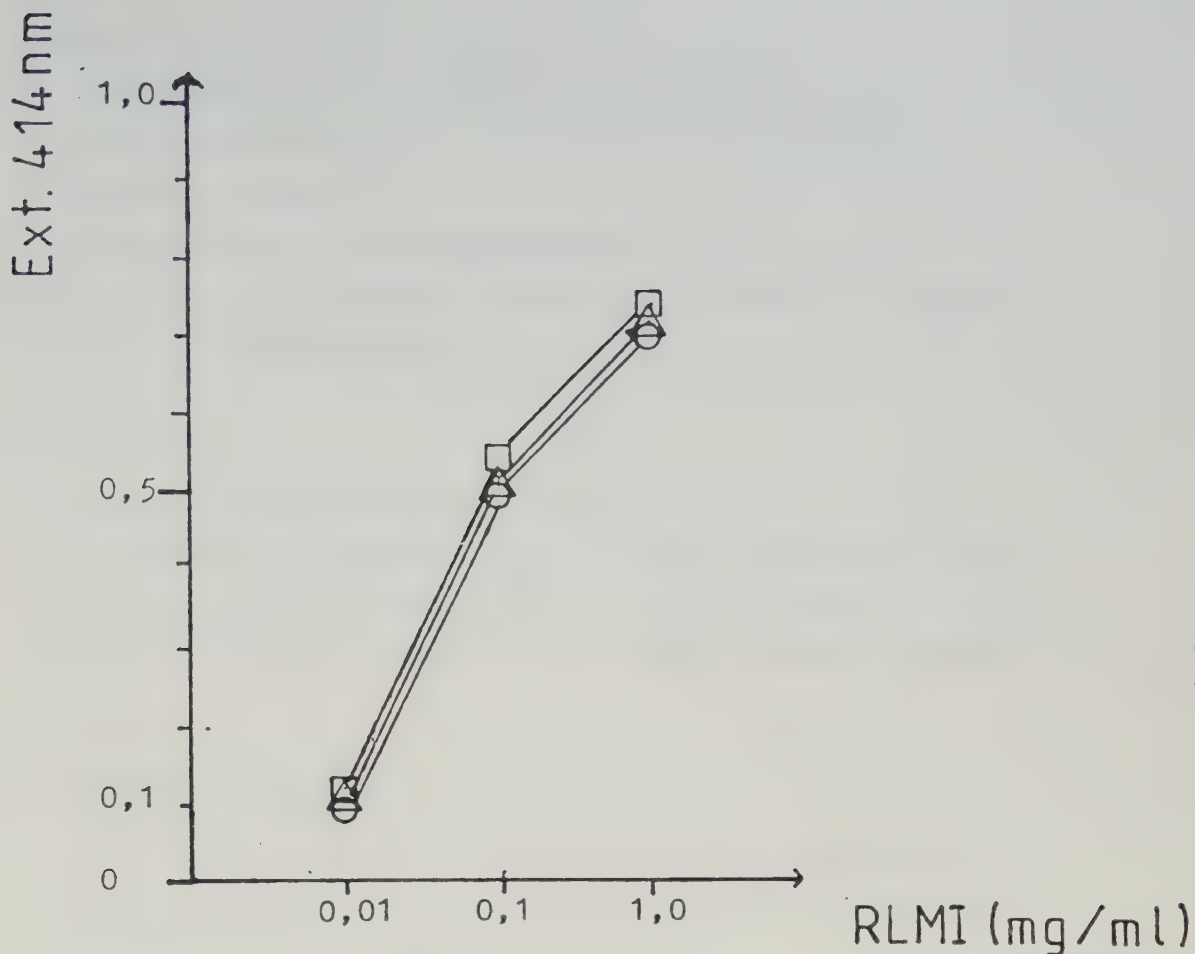


Abb. 2.9.1 Vergleich verschiedener Mikrotiterplatten
(Referenz IgG 0,1 mg/ml, RLMI 1 mg/ml, IgG-Peroxidasekonjugat 12,5 µg/ml, Substrat 50 mM ABTS + 0,0025% H₂O₂, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert)

□ Dynatech M 129 A (Dynatech, Plochingen)

△ Linbro (Flow, Meckenheim)

○ Titertek PVC (Flow, Meckenheim)

Extinktionswert der Negativkontrolle: 0,01

Standardabweichungen kleiner 0,1

(Mittelwerte aus drei Versuchen)

b) Konzentration des Referenz-IgG

Das Referenz-IgG wurde in Konzentrationen von 1,0 bis 0,001 mg/ml, verdünnt in PBS, getestet.

Die besten Ergebnisse wurden bei Konzentrationen von 1,0 und 0,1 mg/ml erzielt. Die Extinktionen bei 1,0 mg/ml lagen aber nur geringfügig über denen bei 0,1 mg/ml, was nicht den zehnfach höheren Einsatz des IgG rechtfertigte. Daher wurde bei den weiteren Versuchen 0,1 mg/ml Referenz-IgG verwendet.

c) Puffer

Das Referenz-IgG wurde mit folgenden Puffern verdünnt:

- + Kaliumphosphatpuffer pH 7,5; 0,01 M mit 0,15 M NaCl (K-PBS)
- + Natriumphosphatpuffer pH 7,5; 0,01 M mit 0,15 M NaCl (Na-PBS)
- + 0,9% NaCl-Lösung
- + Carbonatpuffer pH 9,6 nach Voller et al. 1977

Dabei wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt, der eingeführte K-PBS-Puffer wurde beibehalten.

d) Temperaturen

Die Platten wurden bei folgenden Temperaturen inkubiert:

4°C (Kühlschrank), Raumtemperatur, 37°C und 50°C (Heating Block Micro-elisa System, Organon). Hierbei wurden die besten Ergebnisse bei 4°C erzielt, so daß diese Temperatur für die weiteren Versuche ausgewählt wurde.

2.9.2.2 Waschen (Erstes Mal)

Bei diesem ersten Waschen der Platte erwies sich ein einmaliges Waschen mit PBS als ausreichend, ein- bzw. dreimaliges Waschen mit Tween- oder BSA-PBS brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

2.9.2.3 Nachbeschichten der Platte

a) Puffer

Zum Nachbeschichten wurden folgende Puffer gewählt:

PBS, 0,1% BSA-PBS, 1% BSA-PBS, 1% Haemoglobin-PBS (Hb-PBS), 0,05% Tween 20-PBS.

In den ersten Versuchen zeigte sich, daß Nachbeschichten mit 1,0% BSA-PBS die unspezifische Bindung von Proteinen an die Wand der Platte deutlich besser senkte als 0,1% BSA-PBS (Senkung des Extinktionswertes der Negativkontrolle).

In späteren Versuchen erwies sich dann, daß ein Nachbeschichten mit 0,05% Tween-PBS den gleichen Effekt erzielte, ein Beispiel ist in Abb. 2.9.2 dargestellt.

Es wurde aufgrund der besseren Handhabung und nicht zuletzt auch des niedrigeren Preises wegen Tween-PBS für die weiteren Versuche ausgewählt (s.a. 2.9.2.4).

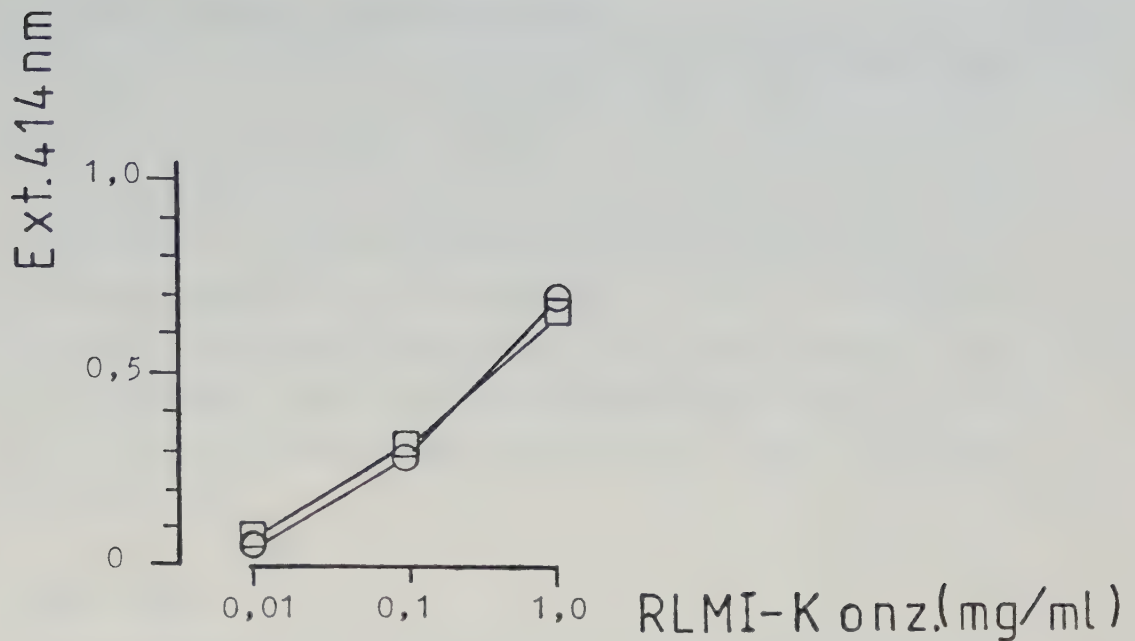


Abb. 2.9.2 Nachbeschichten der Testplatten. Vergleich von 0,05% Tween-PBS und 1% BSA-PBS bei verschiedenen RLMI-Konzentrationen (Referenz-IgG 0,1mg/ml, igG-Peroxidase-Konjugat 12,5µg/ml, Substrat 50 mM ABTS + 0,0025% H₂O₂, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert)

- 0,05% Tween-PBS
- 1% BSA-PBS

b) Dauer des Nachbeschichtens

Eine Stunde Nachbeschichten bei Raumtemperatur mit 0,05% Tween-PBS brachte den gleichen Effekt wie Inkubation über Nacht. Daher wurde diese Zeit als ausreichend angesehen. Die Inkubation über Nacht kann aber genauso gut angewendet werden, sollte dies z.B. aus organisatorischen Gründen notwendig werden.

2.9.2.4 Waschen

Es wurden verschiedene Waschpuffer getestet:

PBS, 0,9% NaCl, 1% BSA-PBS, 0,05% Tween-PBS, 1% BSA-0,05% Tween-PBS. Dabei wurden die besten Ergebnisse bei der Verwendung der drei letzt genannten Waschpuffer erzielt. Untereinander zeigten sich bei diesen jedoch nur geringe Unterschiede. Tween-PBS wurde ausgewählt, da es sich besser handhaben läßt und außerdem einen großen Preisvorteil bietet. Die Kosten für das Waschen belaufen sich bei 10 Platten bei Verwendung von 1% BSA-PBS auf ca. 270 DM, bei 0,05% Tween-PBS auf ca. 0,05DM. Außerdem wurden noch verschiedene Tween 20-Konzentrationen zwischen 0,01% und 1,0% für den Waschpuffer getestet. Hier wurden mit 0,05% Tween-PBS die besten Ergebnisse erzielt.

2.9.2.5 Antigen

Zur Testoptimierung wurde das mitochondriale Antigen aus Rattenleber (RLMI) verwendet.

a) Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des Antigens wurde eine Verdünnungsreihe getestet (5mg/ml bis 0,1mg/ml). Die optimale Konzentration war hierbei 1mg/ml. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.9.3 dargestellt.

b) Ultraschall-Homogenisation

Die Homogenisation wurde mit dem Braun Sonic 125 Homogenisator bei 20 kHz durchgeführt. Es wurden Zeiten zwischen 0 und 45 Sekunden getestet. Bei Zeiten über 45 Sekunden trat trotz Eiskühlung eine Überwärmung auf, so daß diese Zeiten nicht weiter getestet wurden.

Die besten Ergebnisse zeigten über 10 Sekunden mit Ultraschall behandelte Mitochondrien, ein Beispiel ist in Abbildung 2.9.4 dargestellt.

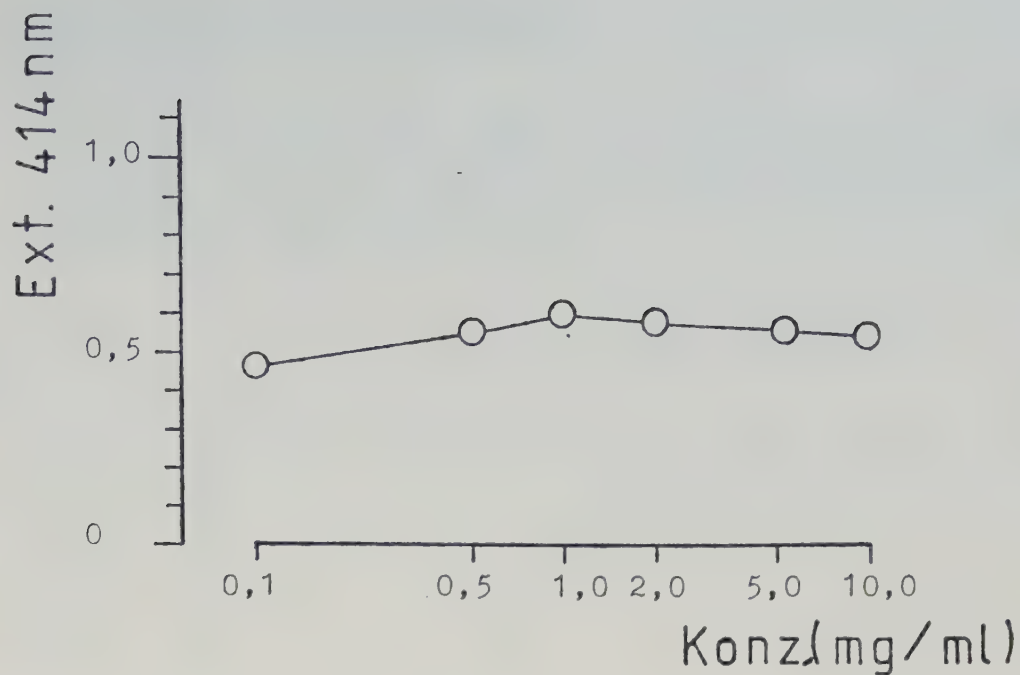


Abb. 2.9.3 Verdünnungsreihe des mitochondrialen Antigens (RLMI)
 (Referenz-IgG 0,1mg/ml, IgG-Peroxidase-Konjugat 12,5 µg/ml,
 Substrat 50 mM ABTS + 0,0025% H_2O_2 , 30Min. bei Raumtemperatur inkubiert)

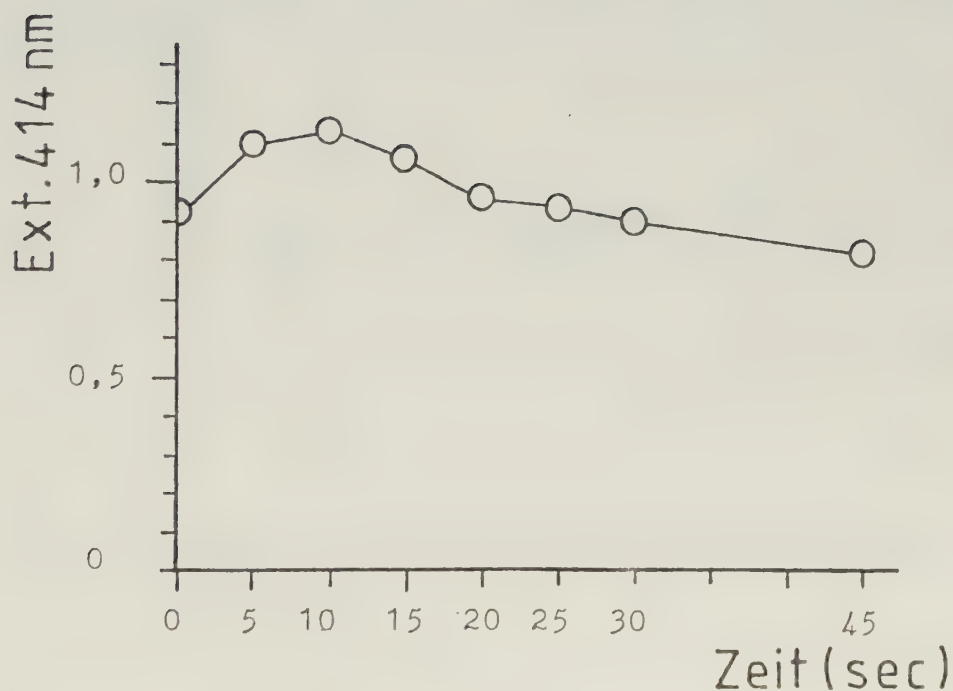


Abb. 2.9.4 Untersuchung des über verschiedene Zeiten mit Ultraschall behandelten mitochondrialen Antigens (RLMI 1mg/ml)
 (Referenz-IgG 0,1mg/ml, IgG-Peroxidase-Konjugat 12,5 µg/ml,
 Substrat 50mM ABTS + 0,0025% H_2O_2 , 30Min. bei 37°C inkubiert)

2.9.2.6 Antikörper-Peroxidase-Konjugat

a) Konzentration

Das IgG-Peroxidase-Konjugat wurde in einer Verdünnungsreihe getestet, ausgehend von einer Konzentration von 100 µg IgG/ml Konjugat. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 2.9.5.

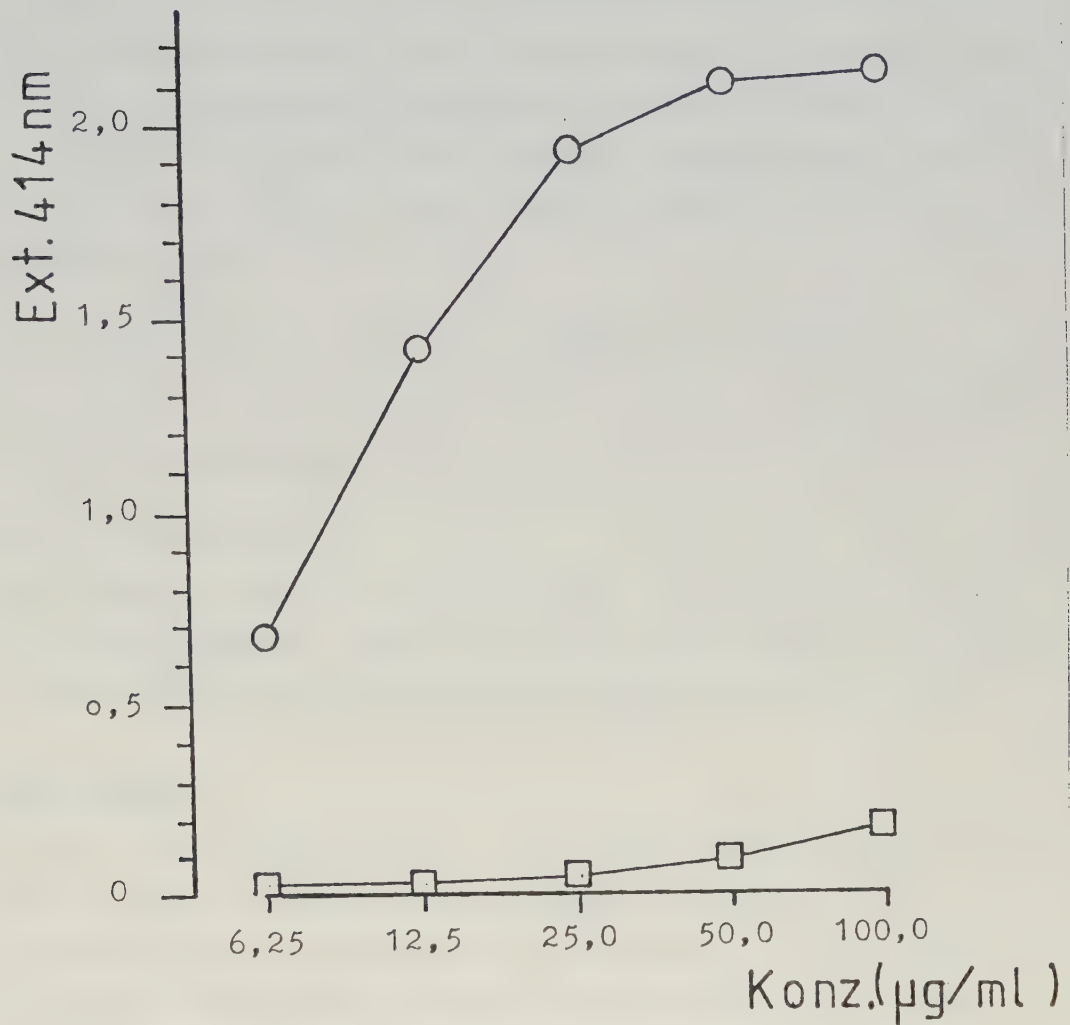


Abb. 2.9.5 Verdünnungsreihe des IgG-Peroxidase-Konjugates
(Referenz-IgG 0,1mg/ml, RLMI 1mg/ml, Substrat 50mM ABTS +
0,0025% H_2O_2)

○ RLMI als Antigen

□ PBS-Kontrolle

Es wurde für die weiteren Versuche eine Konzentration von 12,5 µg IgG/ml Konjugat ausgewählt, da hier bei ausreichender Extinktion der Positivwerte die Negativkontrolle einen niedrigen Wert aufwies. Bei der nächsthöheren Konzentration von 25 µg/ml wurden zwar höhere Extinktionswerte erzielt, bei ebenfalls erhöhtem Negativwert, jedoch wurde bei Extinktionen in diesem Bereich die Grenze des Photometers erreicht, so daß Verdünnungen innerhalb der Platte notwendig wurden, was die Genauigkeit stark herabsetzt.

Eine solche Versuchsreihe muß für jede neue Kopplung durchgeführt werden, da die Extinktion bei bestimmten Konzentrationen abhängig ist vom AMA-Titer des jeweiligen Referenzserums, von der Aktivität des verwendeten Enzyms sowie auch von der Qualität der Kopplung.

b) Verdünnungspuffer

Zur Verdünnung des Konjugates wurden folgende Puffer getestet:

PBS, 1%, 2% und 5% BSA-PBS. Die besten Ergebnisse wurden unter Verwendung von 5% BSA-PBS erzielt, so daß dieser Verdünnungspuffer für die weiteren Tests beibehalten wurde.

c) Inkubationstemperatur

Das Konjugat wurde bei 4°C, Raumtemperatur, 37°C und 50°C inkubiert. Die besten Ergebnisse wurden bei Raumtemperatur erreicht, bei höheren Temperaturen stiegen die Extinktionen der Negativkontrollen stark an.

2.9.2.7 Substrat

Es wurden neben ABTS auch noch o-Phenylendiamin und 5-Aminosalicylsäure als Substrat getestet aufgrund verschiedener Mitteilungen in der Literatur (Mathiesen et al. 1978, Ghielmi et al. 1982, Östermal et al. 1979, Voller et al. 1976). Es wurden aber nur geringere Extinktionen erzielt als mit ABTS, so daß bei den weiteren Versuchen ABTS verwendet wurde.

a) Konzentrationen von ABTS

Es wurden folgende Konzentrationen von ABTS getestet:

100 mM/l, 50 mM/l, 25 mM/l.

50 mM/l brachte bei ausreichender Zeit gute Ergebnisse, während die 100 mM-Lösung nach kurzer Zeit ausfiel.

b) H_2O_2 -Konzentrationen

Es wurden Verdünnungsreihen zwischen 0,01% und 0,000625% H_2O_2 getestet. Die besten Ergebnisse brachte eine Konzentration von 0,0025% H_2O_2 , ein Beispiel hierfür ist in Abb. 2.9.6 dargestellt.

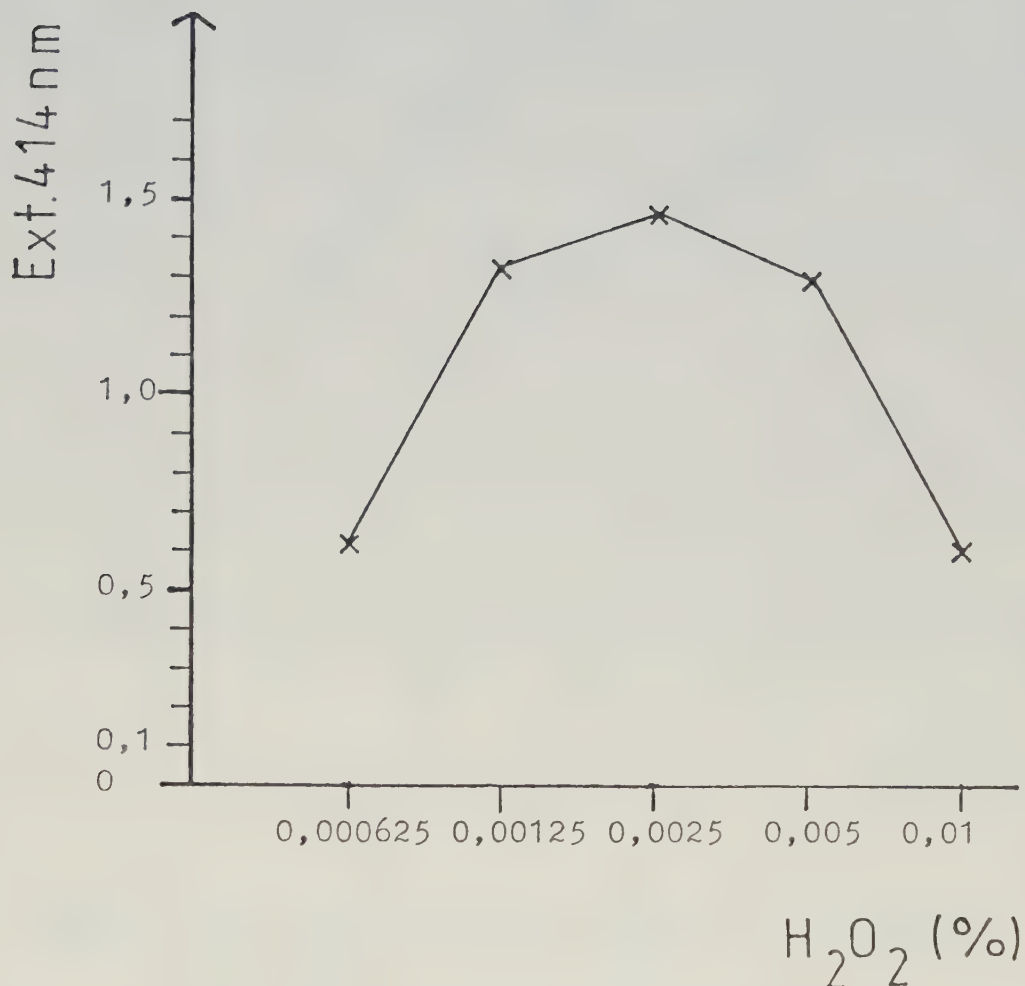


Abb. 2.9.6 Untersuchung verschiedener H_2O_2 -Konzentrationen im Substrat (50mM ABTS)
(Referenz-IgG 0,1mg/ml, RLMI 1mg/ml, IgG-Peroxidase-Konjugat 12,5 μ g/ml)

c) Inkubationsdauer und Temperatur

Das Substrat wurde bei Temperaturen von 4°C, Raumtemperatur, 37°C und 50°C getestet, die Inkubationszeiten variierten zwischen 10 und 60 Minuten. Am günstigsten erwies sich eine Inkubationsdauer von 30 Minuten bei 37°C. Ein Beispiel zeigt Abbildung 2.9.7.

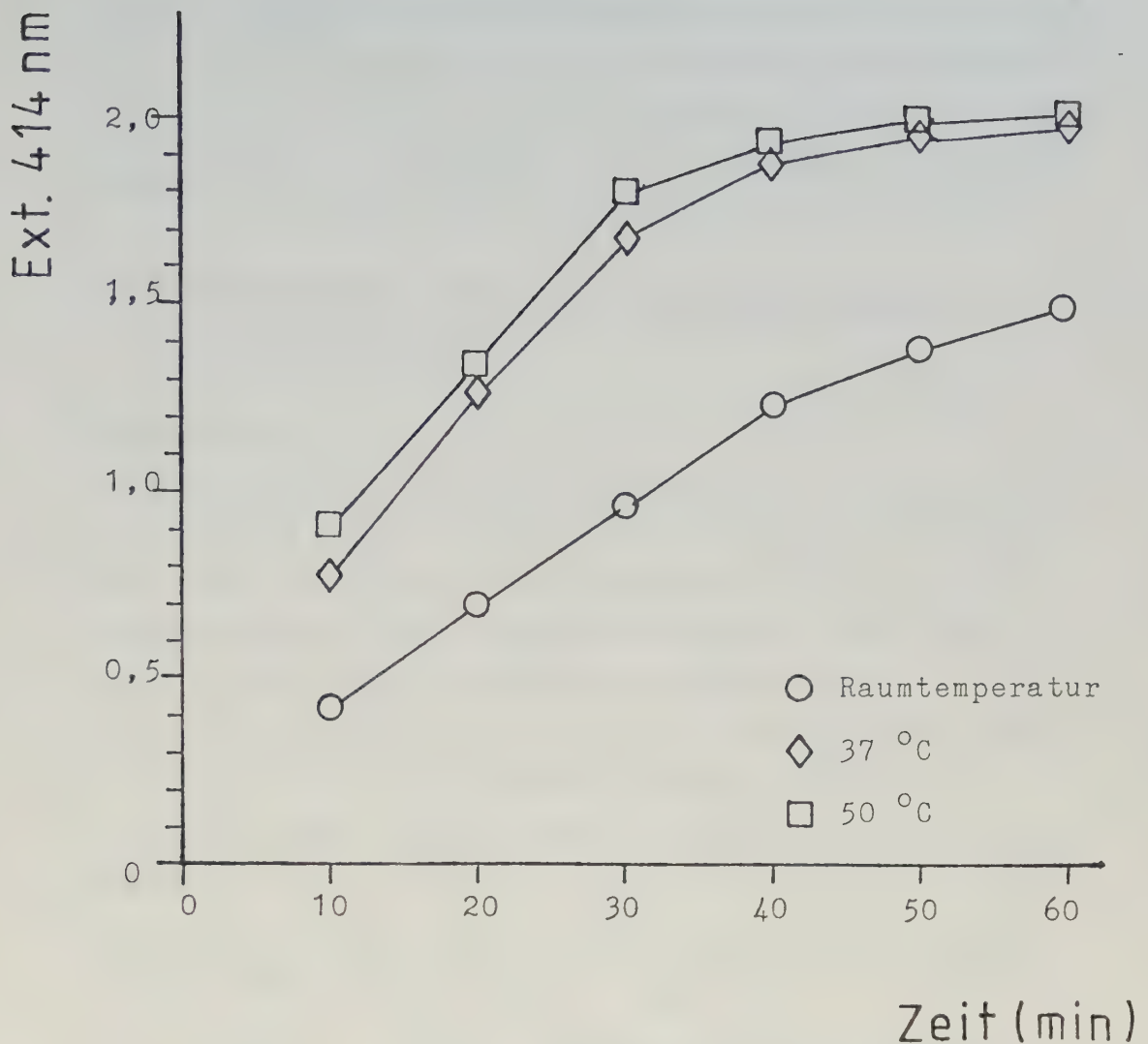


Abb. 2.9.7 Untersuchung verschiedener Reaktionszeiten und Temperaturen für das Substrat
 (Referenz-IgG 0,1 mg/ml, RLMI 1mg/ml, IgG-Peroxidase-Konjugat 12,5 µg/ml, 50 mM ABTS + 0,0025% H_2O_2)

Bei 4°C blieben die Extinktionen zu niedrig, bei der Raumtemperatur führten Schwankungen zwischen 16 und 35°C bei diesem Versuchsschritt zu starken Ergebnisschwankungen, bei Inkubation bei 50°C kam es bereits zu Vertrocknungen. Bei 37°C wurden nach 30 Minuten ausreichende Extinktionen erreicht, darüber hinaus wurde der Grenzbereich des Photometers erreicht.

2.9.3 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testsystems

Es wurde sowohl die Intraassay-Reproduzierbarkeit (Fünffach-Bestimmung in einem Ansatz) als auch die Interassay-Reproduzierbarkeit durch Bestimmung in verschiedenen Ansätzen an fünf verschiedenen Tagen für den Enzymimmunoassay zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens durchgeführt. Verwendet wurde RLMI in einer Konzentration von 1 mg/ml.

2.10 Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen

2.10.1 Testsystem

Zum Nachweis von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen wurde das blockierende System gewählt. Es wurde untersucht, ob zu testende Patientenseren die Reaktion des Referenzantikörpers mit dem mitochondrialen M 2-Antigen inhibieren. Deshalb wurde der in 2.9 beschriebene Enzymimmunoassay erweitert. Es zeigt sich nun folgender Ablauf:

- a) Die Testplatte wurde mit 50 µl Referenz-IgG beschichtet (0,1 mg/ml), Inkubation 3 Stunden bei 4°C, anschließend Waschen mit PBS.
- b) Nachbeschichten mit 0,05% Tween-PBS, dreimal Waschen mit 0,05% Tween-PBS
- c) Je 50 µl RLMI (1mg/ml) wurden eingefüllt, Inkubation über Nacht bei 4°C. Anschließend dreimal Waschen mit 0,05% Tween-PBS.
- d) Es wurden 50 µl der Testserumverdünnung eingesetzt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Seren wurden 1:20 in PBS verdünnt, bei Titerbestimmungen entsprechend höher. Zur Berechnung der Inhibition (s.u.) wurde ein Referenzserum, gepoolt aus den Seren dreier lebergesunder Normalpersonen (NHS) mitgetestet, daneben eine Negativkontrolle (PBS anstelle von Antigen und Serum). Anschließend wurde dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.
- e) 50 µl Antikörper-Peroxidase-Konjugat (12,5µg IgG/ml in 5% BSA-PBS) wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal Waschen mit 0,05% Tween-PBS.
- f) 50 mM ABTS-Lösung mit 0,0025% H₂O₂, je 20 µl pro Testansatz, wurden 30 Minuten bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Farbreaktion mit 2 mM Natriumacidlösung gestoppt und die Extinktion bei 414 nm gemessen.

Die Berechnung der Inhibition erfolgte nach folgender Formel:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{\text{Extinktion NHS} - \text{Extinktion Testserum}}{\text{Extinktion NHS} - \text{Extinktion Kontrolle}} \times 100 \quad (\%)$$

2.10.2 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testsystems

Es wurde auch hier sowohl die Intraassay- als auch die Interassay-Reproduzierbarkeit getestet. Untersucht wurden jeweils fünf Seren, drei Positiv- und zwei Negativseren.

2.11 Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen in der IgM-Fraktion von Patientenseren

Untersuchungen zur Aktivität von AMA-M 2-spezifischen Antikörpern in der IgM-Fraktion wurden mit verschiedenen Testansätzen durchgeführt. Zum einen wurden verschiedene Enzymimmunoassays zur direkten Untersuchung von Patientenseren getestet, zum anderen wurde die durch Gelfiltration gereinigte IgM-Fraktion von Patientenseren untersucht.

2.11.1 Enzymimmunoassays zum direkten Nachweis IgM-spezifischer antimitochondrialer Antikörper in Patientenseren

Es wurden drei verschiedene Prinzipien der Durchführung eines Enzymimmunoassays angewendet, um die Aktivität der Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen in der IgM-Fraktion von Patientenseren im direkten Nachweis zu bestimmen. Die Prinzipien dieser Enzymimmunoassays sind im folgenden beschrieben, eine schematische Darstellung zeigt die Abbildung 2.11.1.

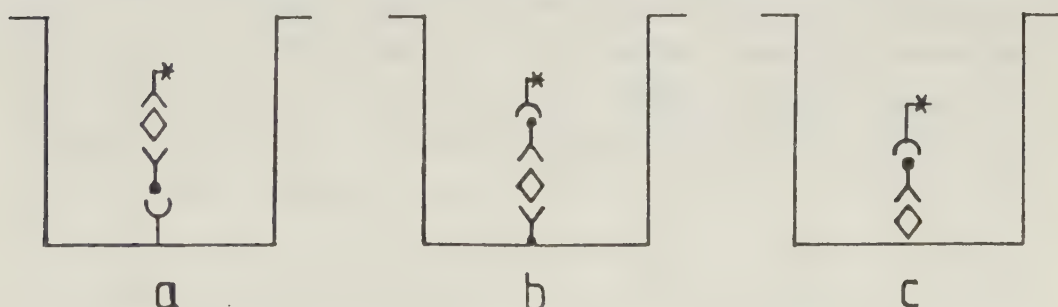


Abb. 2.11.1 Schematische Darstellung der Prinzipien der Enzymimmunoassays zur Untersuchung der Aktivität von Antikörpern in der IgM-Fraktion von Patientenseren

- Y Anti-Human-IgM-Immunglobulin
- Y AMA (IgG bzw. IgM in Patientenseren)
- ◇ RLMI
- * Peroxidase gekoppelte Antikörper

2.11.1.1 Enzymimmunoassay I

- ... Dieser Enzymimmunoassay wurde entwickelt analog dem von Feinman et al. 1982 beschriebenen RIA mit der sogenannten "antibody capture method" sowie auch anhand der von Duermeyer et al. 1980 und Abu Elzein et al. 1981 beschriebenen Enzymimmunoassays für IgM-spezifische Antikörper.

Beschreibung des Enzymimmunoassays I:

- a) Die Mikrotiterplatte wurde mit Gammaglobulin beschichtet, welches aus Immunglobulinklassenspezifischen Seren Kaninchen-anti-Human (Behringwerke, Marburg) durch Ammoniumsulfatfällung (Manns et al. 1982) gewonnen wurde. Dabei wurden Konzentrationen von 1–100 µg getestet. Es wurden 50 µl pro Ansatz aufgegeben, drei Stunden bei 4°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen. Darauf folgte die Nachbeschichtung mit 0,05% Tween-PBS über eine Stunde, danach wurde dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.
- b) Es wurden Patientenserum getestet mit Verdünnungen von 1:1 bis 1:1000, 50 µl wurden pro Ansatz eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.
- c) Es wurden nun RLMI aufgegeben (1 mg/ml, 50 µl/Ansatz) und analog des Enzymimmunoassay zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens (2.9.1) fortgefahren.

2.11.1.2 Enzymimmunoassay II

Das Schema dieses Enzymimmunoassays ist in Abbildung 2.11.1b dargestellt.
Durchführung:

- a) Es erfolgt zunächst das Beschichten mit Referenz-IgG, Waschen, Nachbeschichten mit 0,05% Tween-PBS, abermaliges Waschen, Antigenzugabe (RLMI, 1 mg/ml) und Waschen wie beim Enzymimmunoassay zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens (2.9.1). Anschließend wurden Testserum in Verdünnungen von 1:1 bis 1:5000 aufgegeben, je 50 µl/Ansatz wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- b) Nach dreimaligem Waschen mit 0,05% Tween-PBS wurde spezifisches Ziege-Anti-Human-IgM Antikörper-Peroxidase-Konjugat (Sigma, München) in Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 in 1% BSA-PBS aufgegeben, je 50 µl pro Ansatz wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.
- c) Nach weiterem Waschen wurde als Substrat 50 mM ABTS + 0,0025% H₂O₂ aufgegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.11.1.3 Enzymimmunoassay III

Dieser Enzymimmunoassay entspricht im Prinzip der von Voller et al. 1978 skizzierten Methode des ELISA zur Antikörperbestimmung. (Schema s. Abb. 2.11.1c)

Durchführung :

a) Zum Beschichten wurde RLMI verwendet in Konzentrationen von 0,5 bis 2mg/ml, 50µl/Ansatz. Es wurde drei Stunden bei 4°C inkubiert, anschließend mit PBS gewaschen, nachbeschichtet, dann dreimal mit 0,05% Tween- PBS gewaschen.

b) Danach wurden die Testseren aufgegeben in Verdünnungen von 1:1 bis 1:1000 in PBS, 50µl/Ansatz. Es wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.

c) Nun wurde spezifisches Ziege-anti-Human-IgM Antikörper-Peroxidase-Konjugat (Sigma, München) in Verdünnungen von 1:500 und 1:1000 in 1% BSA-PBS aufgegeben. 50µl/Ansatz wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurde dreimal mit 0,05% Tween-PBS gewaschen.

d) Als Substrat wurde 50 mM ABTS mit 0,0025% H_2O_2 aufgegeben und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.11.2 Nachweis antimitochondrialer Antikörper in der gereinigten

IgM-Fraktion von Patientenseren

Zur Auftrennung der Immunglobulinklassen von Testseren wurde eine Sephacryl S-300 Gelfiltrationssäule (Pharmacia, Freiburg) verwendet (Höhe 27cm, Säulenvolumen 13,6 cm³, Flußrate 4ml/h). Als Elutionspuffer wurde Tris-EDTA-Puffer pH 8,0 verwendet.

Je 100µl des aufzutrennenden Serums wurden aufgetragen, das Eluat wurde in Fraktionen von 9 Tropfen aufgefangen. Während des Ablaufes der Gelfiltration wurde die Transmission bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt aufgezeichnet. Ein Beispiel für die erhaltenen Kurven gibt die Abbildung 2.11.2. Die aufgefangenen Fraktionen wurden bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert.

Die mit der Gelfiltration gewonnenen Fraktionen wurden mit dem in 2.5.3 beschriebenen Enzymimmunoassay zur semiquantitativen Bestimmung der Immunglobulinklassen getestet. Ein Beispiel ist in Abbildung 2.11.3 dargestellt.

Diejenigen Fraktionen, die in der semiquantitativen Bestimmung einen hohen IgM-Gehalt, aber nur geringe Extinktionen bei IgA und IgG aufwiesen, wurden in der radialen Immundiffusion nach Mancini weiter untersucht, um eine quantitative Bestimmung der Immunglobuline zu erhalten. Untere Nachweisgrenze der LC-Partigen-Platten (Behringwerke, Marburg): 1,1 mg/dl für IgM, 0,8 mg/dl für IgG, 0,8 mg/dl für IgA.

Die Fraktionen, bei denen in der radialen Immundiffusion nur IgM, nicht aber IgA oder IgG nachgewiesen wurde, wurden anschließend mit dem in 2.10 beschriebenen Enzymimmunoassay auf ihre Antikörperaktivität gegen das mitochondriale M 2-Antigen getestet. Bei den positiv reagierenden Seren wurde mittels einer Verdünnungsreihe die letzte noch positiv reagierende IgM-Konzentration bestimmt.

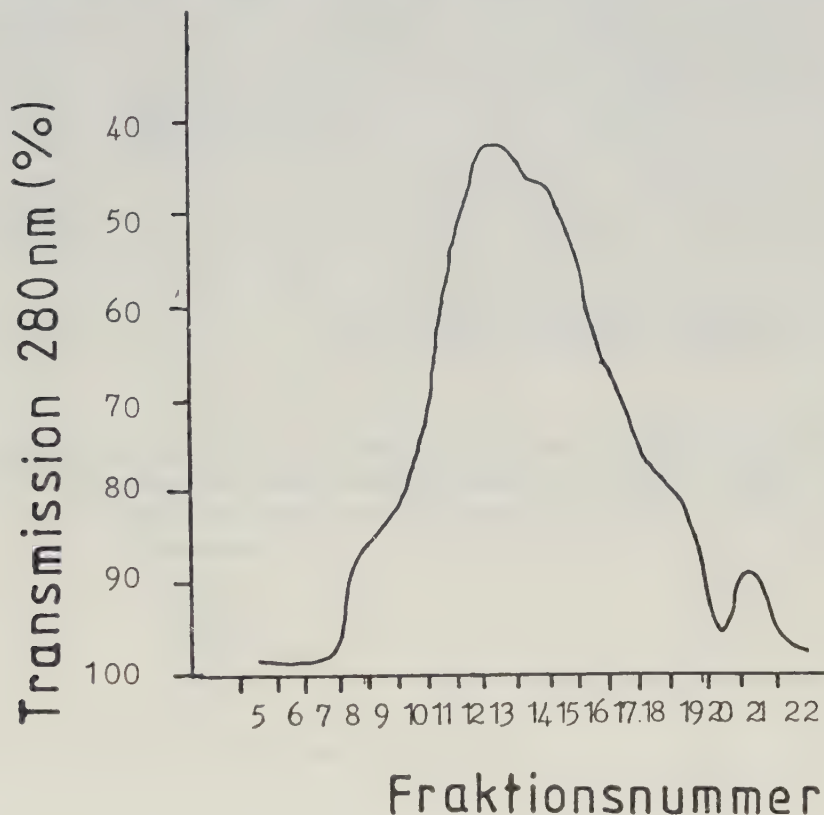


Abb. 2.11.2 Auftrennung eines Patientenserums mittels Sephacryl S-300 Gel-filtration; kontinuierlich bestimmte Transmission bei 280 nm als Maß für den Proteingehalt.

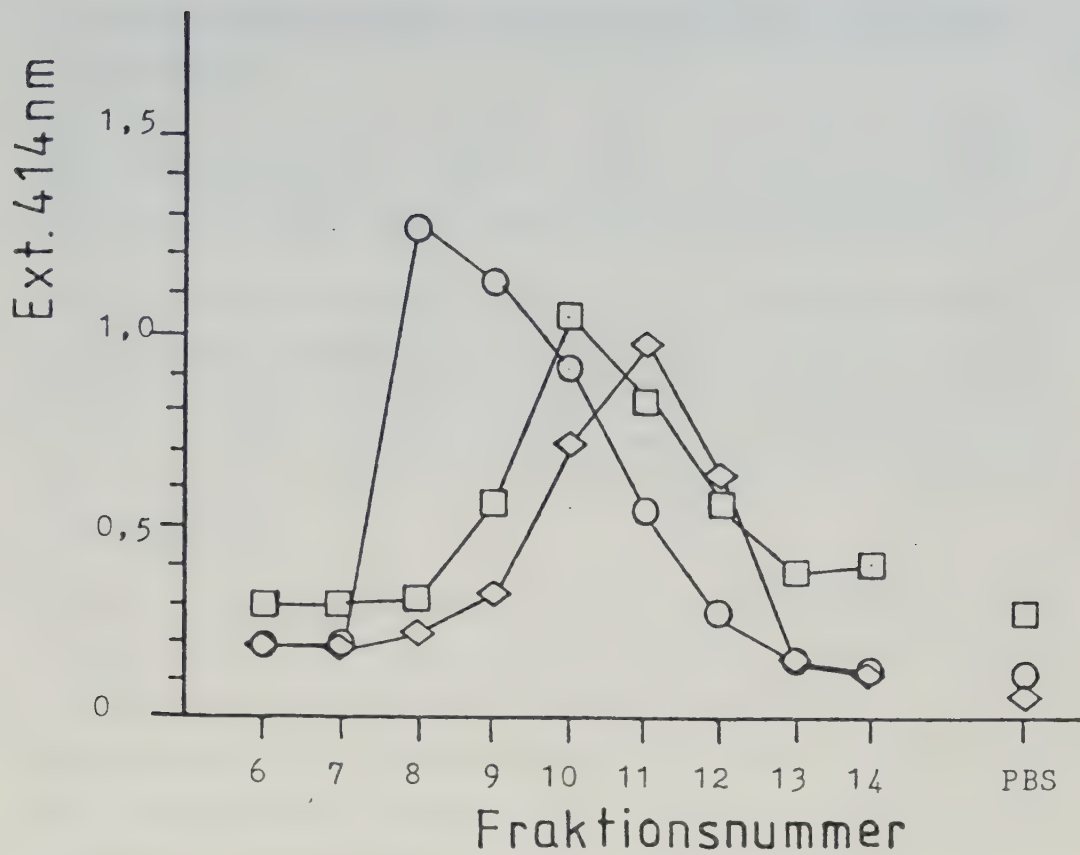


Abb. 2.11.3 Semiquantitative Bestimmung der Immunglobulinklassen in Fraktionen eines Patientenserums, die durch Sephacryl S-300 Gelfiltration gewonnen wurden, durchgeführt mittels Enzym-immunoassay.

- ◇ IgG
- IgM
- IgA

(PBS-Kontrolle anstelle Antigen)

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchungen zur Organ- und Spezies-Spezifität des mitochondrialen M 2-Antigens

Mitochondrienpräparationen zahlreicher Organe von Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Maus und Mensch wurden auf die Expression des mitochondrialen M 2-Antigens mittels des Enzymimmunoassays untersucht.

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.1.1 bis 3.1.5 dargestellt. Untersucht wurden jeweils Antigenpräparationen in der Konzentration von 1mg/ml. Daneben ist auf den Abbildungen jeweils der Wert einer Negativkontrolle (PBS anstelle von Antigen) dargestellt. Die abgebildeten Extinktionen stellen jeweils den Mittelwert aus drei Versuchen dar, eingezeichnet ist ebenfalls die Standardabweichung.

Die Tests wurden als positiv gewertet, wenn das Extinktionsverhältnis von Antigen zur PBS-Kontrolle den Wert von 2,1 überstieg. Diese Positiv-Negativ-Grenze wurde ebenfalls in den Abbildungen eingezeichnet.

Weiterhin wurden die Antigenpräparationen aus der Leber von Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen, Maus und Mensch sowie aus der Niere von Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen und Maus in einer Verdünnungsreihe dargestellt.

Dabei wurden Konzentrationen von 10 mg/ml bis 0,01 mg/ml getestet. Abbildung 3.1.6 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung der Antigene aus der Leber, Abbildung 3.1.7 der Antigene aus der Niere. Es wurden jeweils die Mittelwerte aus drei Versuchen dargestellt, auf die Eintragung der Standardabweichung wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet, ihr höchster Wert betrug 0,09.

Es konnte bei der Ratte das M 2-Antigen deutlich positiv nachgewiesen werden in Leber, Niere, Lunge, Herz, Hoden, Hirn und Kleinhirn, schwächer positiv in Milz, Ösophagus, Magen, Kolon, Nebenhoden, Prostata, Schilddrüse und Skelettmuskel. Kein Nachweis gelang bei Pankreas und Dünndarm.

Beim Kaninchen gab es einen deutlich positiven Nachweis bei Leber, Lunge, Hirn und Skelettmuskel, schwächer positiv bei Milz, Niere, Herz, Schilddrüse und Kleinhirn. Im Grenzbereich lagen Pankreas, Magen, Dünndarm und Kolon. Für die Organpräparationen vom Meerschweinchen konnte das M 2-Antigen stark positiv nachgewiesen werden in Niere, Magen und Kolon, schwächer war der Nachweis bei Leber, Lunge, Dünndarm und Skelettmuskel.

Bei der Maus gelang ein deutlich positiver Nachweis bei Leber, Milz, Niere, Lunge und Hirn, schwächer positiv bei Herz, Pankreas, Kolon und Skelettmuskel, im Grenzbereich lagen Magen, Dünndarm und Schilddrüse.

Das M 2-Antigen konnte auch positiv nachgewiesen werden in Mitochondrien aus humaner Leber.

Im Vergleich der Mitochondrienpräparationen aus der Leber der verschiedenen Spezies zeigte sich bei allen ein deutlich positiver Nachweis des M 2-Antigens.

Beim Vergleich der Nierenmitochondrien ergab sich bei den Präparaten von Ratte und Maus ein deutlicherer Nachweis des mitochondrialen M 2-Antigens als bei Meerschweinchen und Kaninchen.

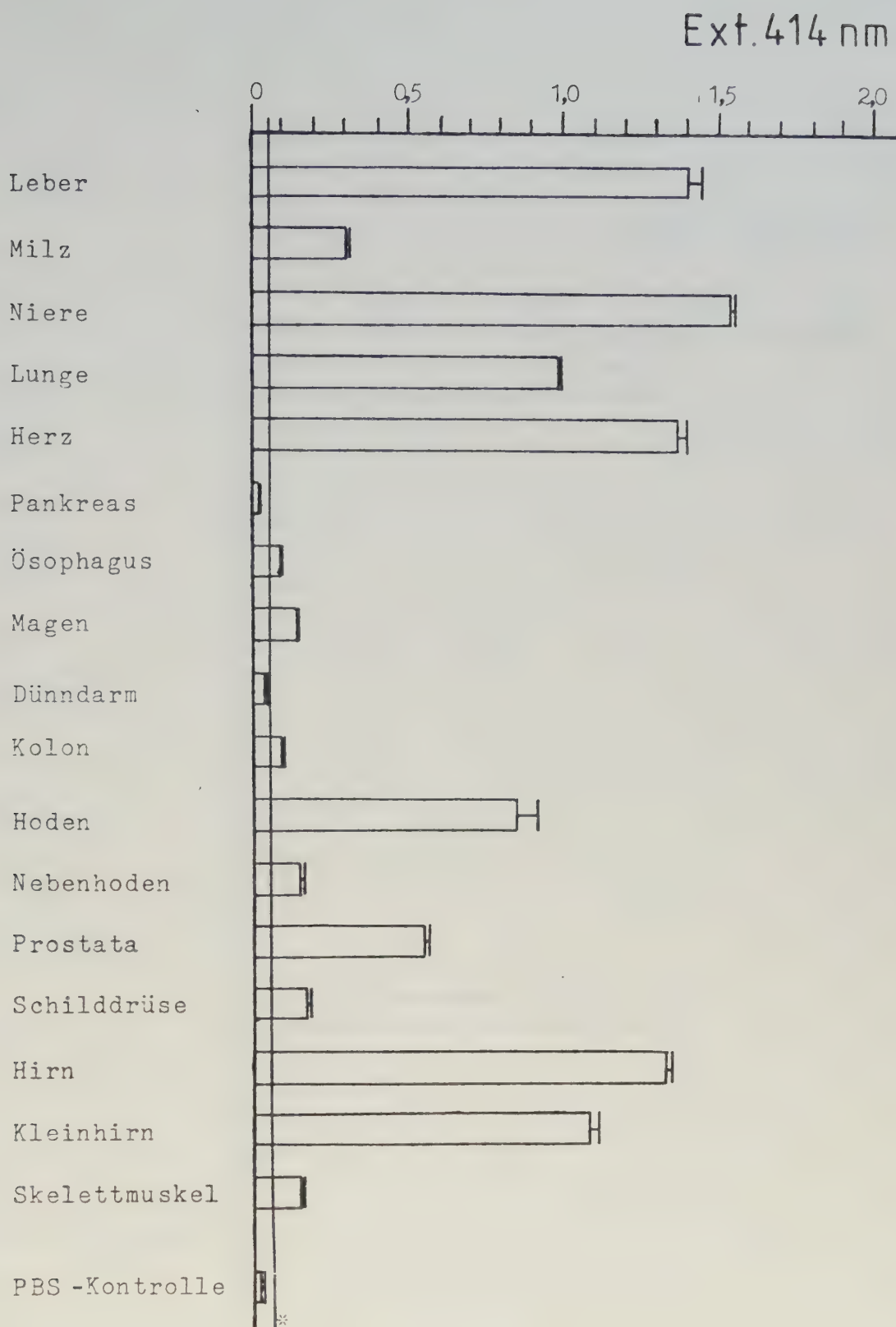


Abb. 3.1.1 Untersuchungen zur Organspezifität des mitochondrialen M 2-Antigens bei der RATTE. Gereinigte Mitochondrienpräparationen in einer Proteinkonzentration von 1mg/ml wurden jeweils eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Versuchen, außerdem die Positiv-Negativ-Grenze (*) des Enzymimmunoassays.

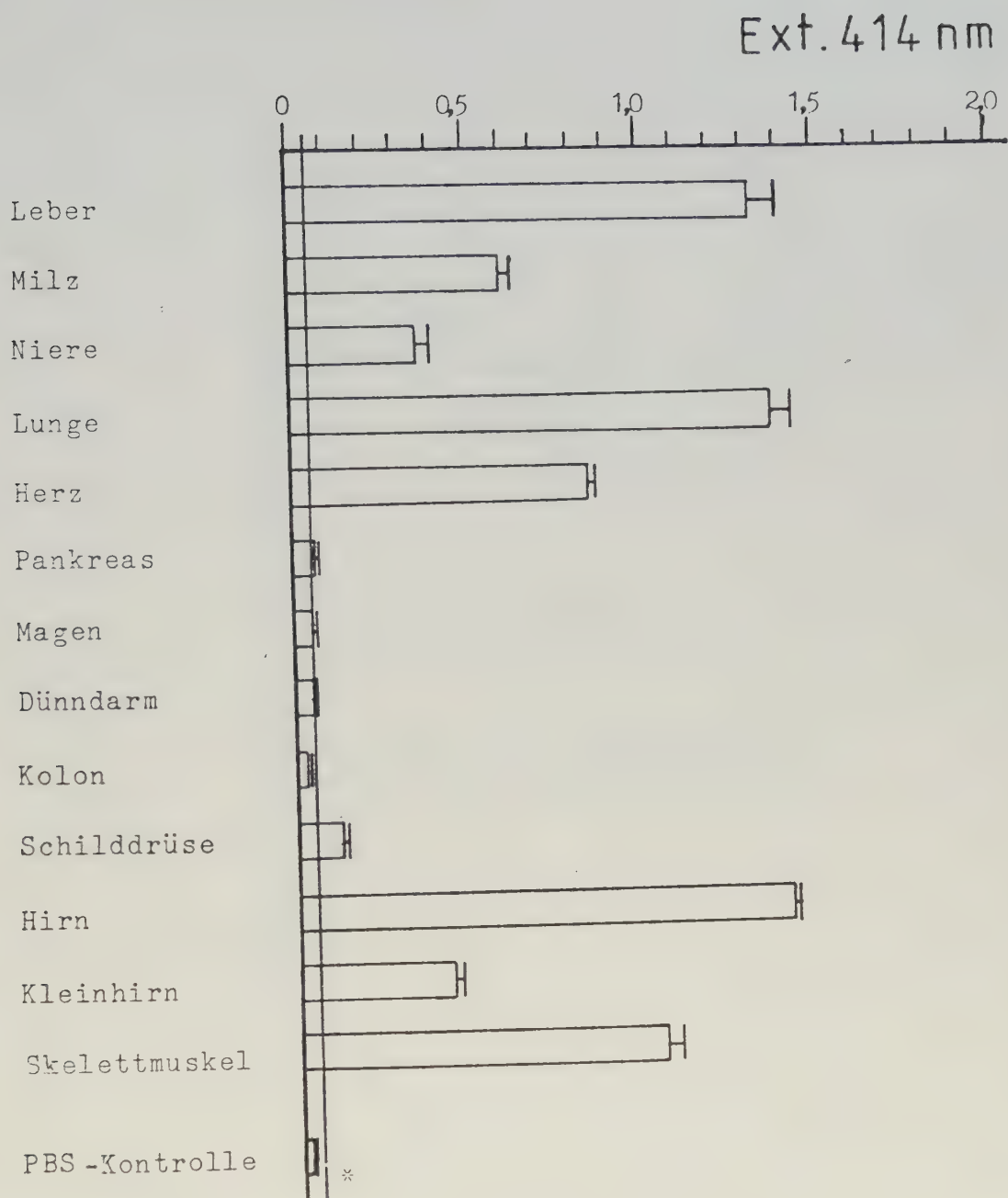


Abb. 3.1.2 Untersuchungen zur Organspezifität des mitochondrialen M 2-Antigens beim KANINCHEN. Gereinigte Mitochondrienpräparationen in einer Proteinkonzentration von 1mg/ml wurden jeweils eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Versuchen, außerdem die Positiv-Negativ-Grenze (*) des Enzymimmunoassays.

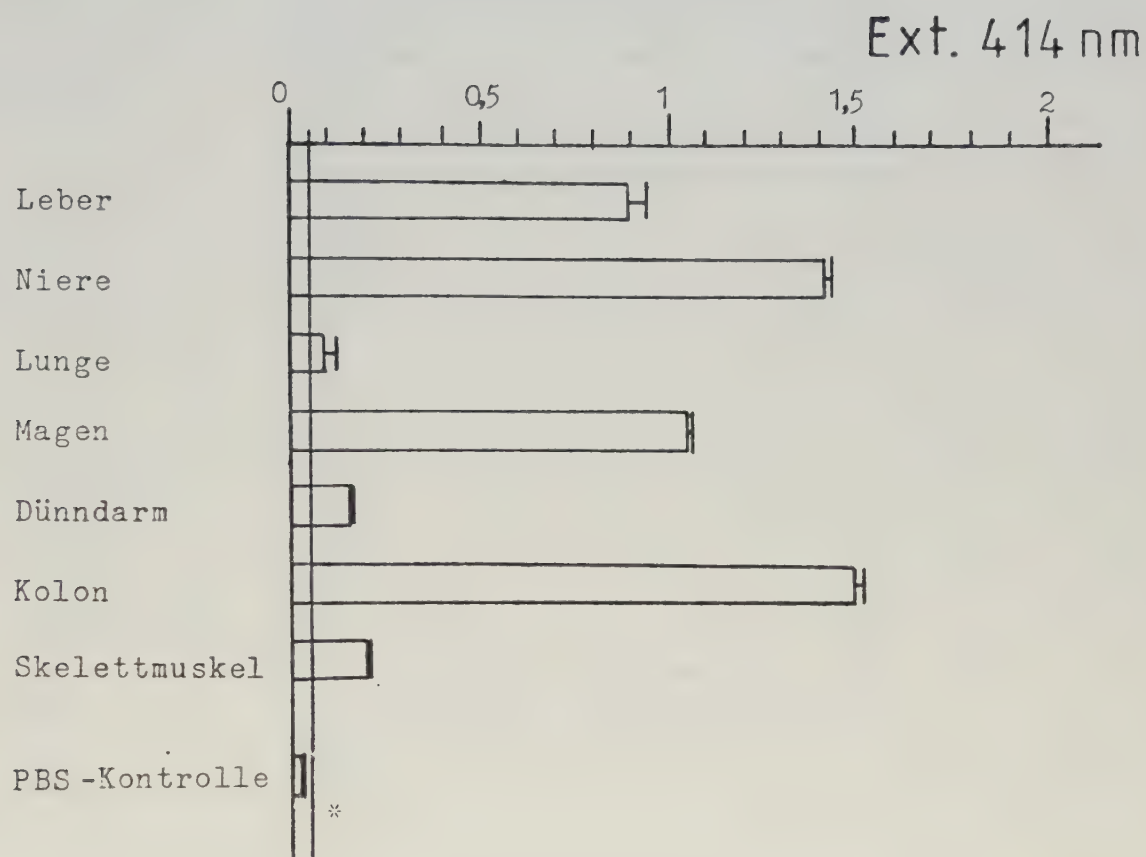


Abb. 3.1.3 Untersuchungen zur Organspezifität des mitochondrialen M 2-Antigens beim MEERSCHWEINCHEN. Gereinigte Mitochondrienpräparationen in einer Proteinkonzentration von 1mg/ml wurden jeweils eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Versuchen, außerdem die Positiv-Negativ-Grenze (*) des Enzymimmunoassays.

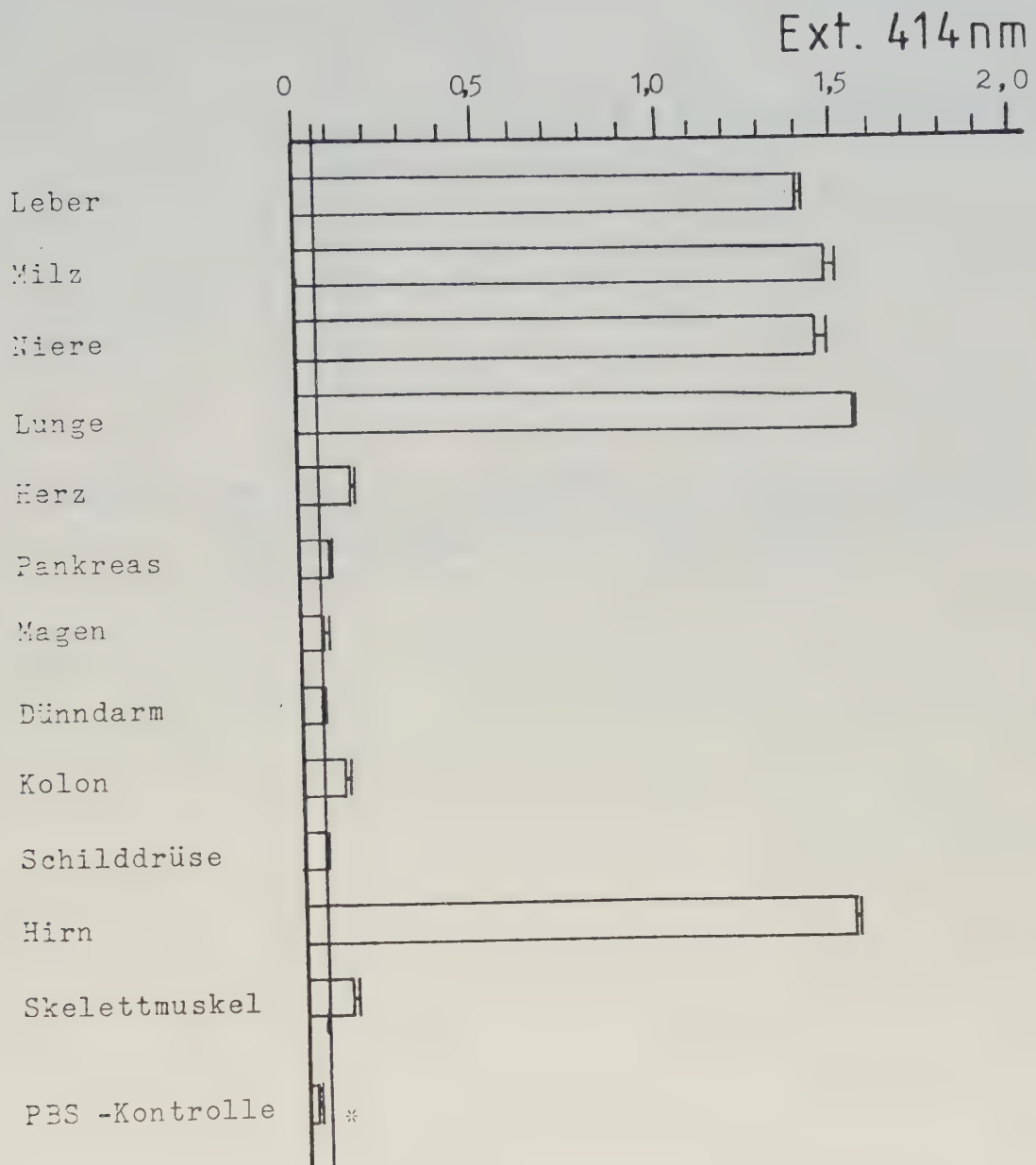


Abb. 3.1.4 Untersuchungen zur Organspezifität des mitochondrialen M 2-Antigens der MAUS. Gereinigte Mitochondrienpräparationen in einer Proteinkonzentration von 1mg/ml wurden jeweils eingesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus drei Versuchen, außerdem die Positiv-Negativ-Grenze (*) des Enzymimmunoassays.

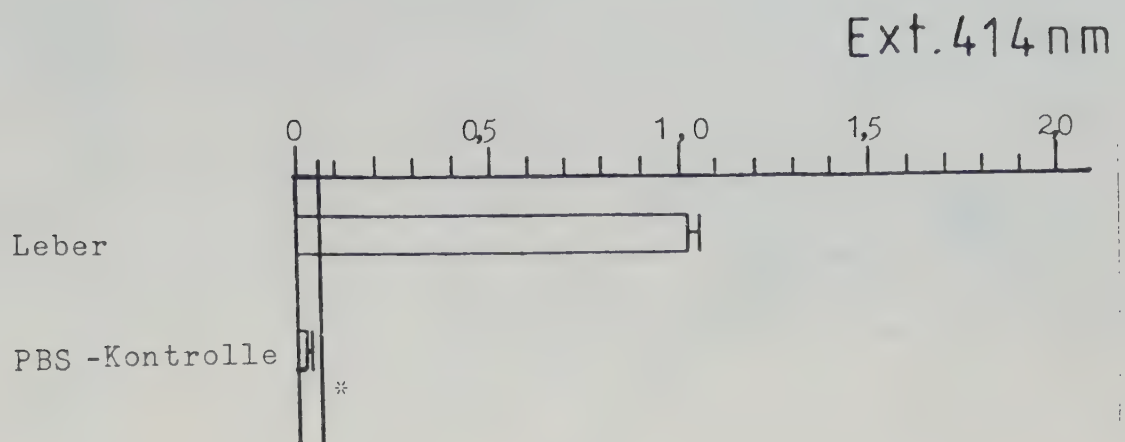


Abb. 3.1.5 Nachweis des mitochondrialen M 2-Antigens in HUMANER Leber, Antigenkonzentration 1 mg/ml. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung aus drei Versuchen, sowie die Positiv-Negativ-Grenze (*) des Enzymimmunoassays.

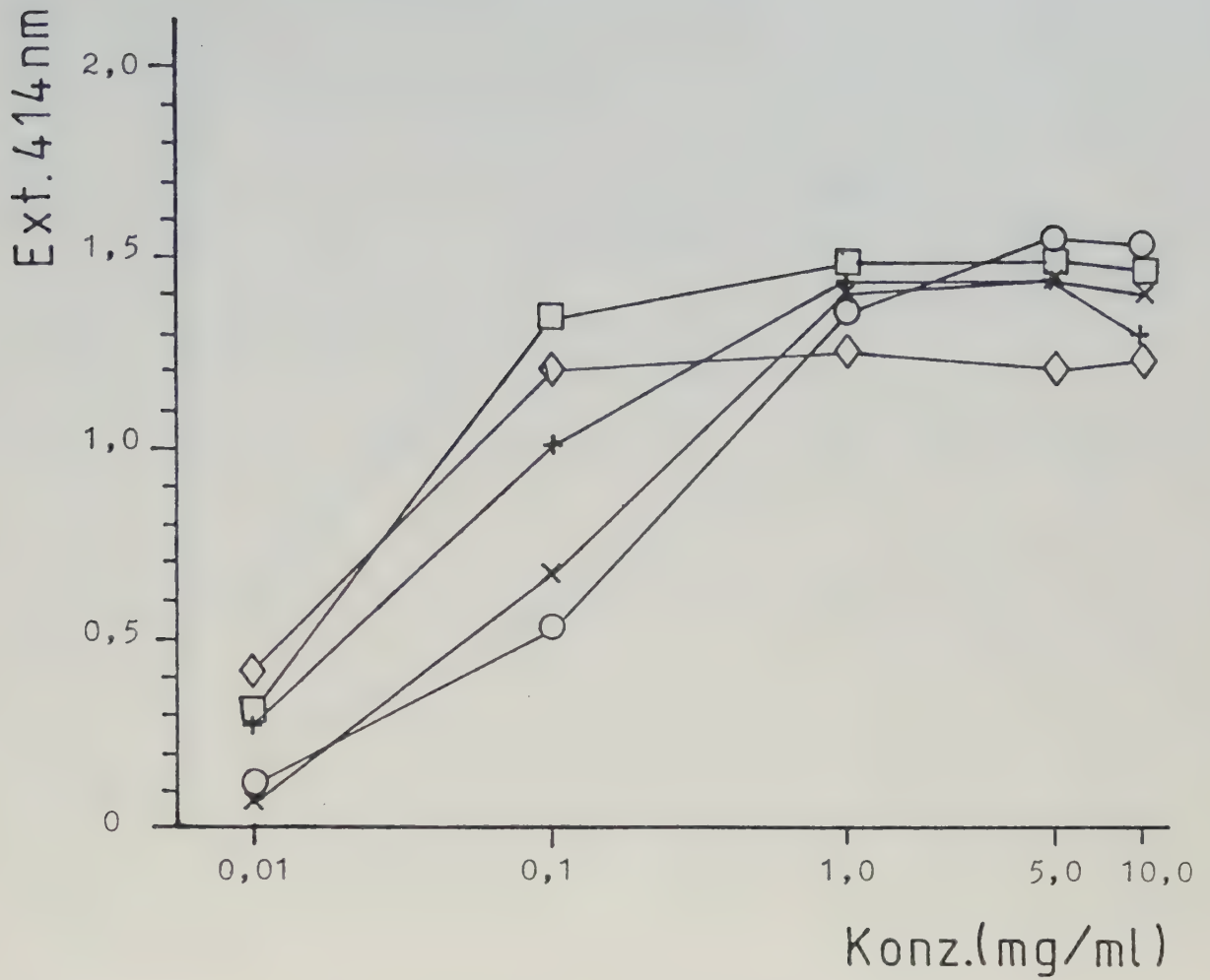


Abb. 3.1.6 Untersuchungen zur Spezies-Spezifität des mitochondrialen M 2-Antigens aus der Leber. Es sind die Mittelwerte aus drei Versuchen dargestellt.

- Ratte
- ◇ Maus
- × Meerschweinchen
- + Kaninchen
- Mensch

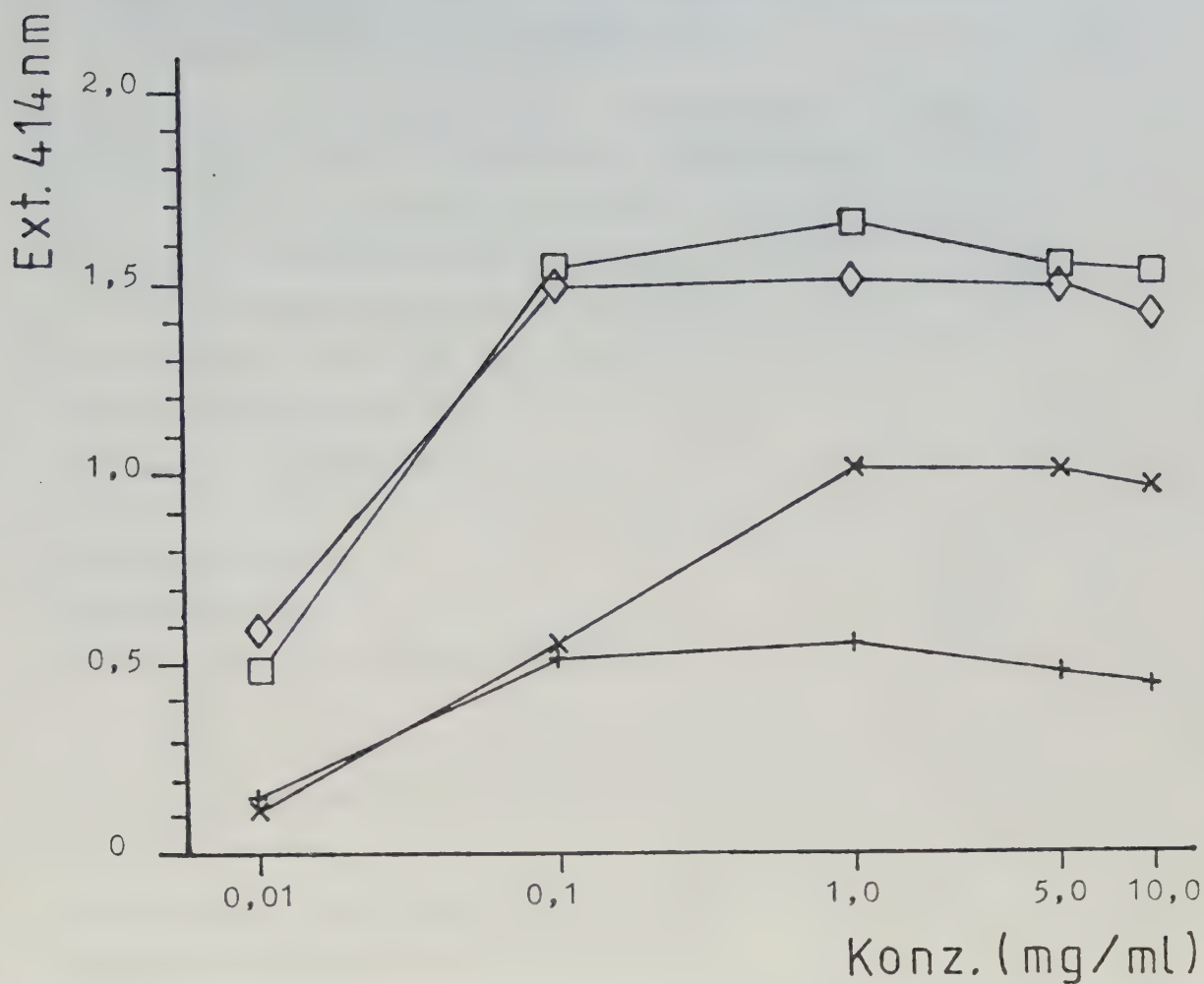


Abb. 3.1.7 Untersuchungen zur Spezies-Spezifität des mitochondrialen M 2-Antigens aus der Niere. Es sind die Mittelwerte aus drei Versuchen dargestellt.

- Ratte
- ◇ Maus
- × Meerschweinchen
- + Kaninchen

3.2 Inzidenz der Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen in Patientenseren, bestimmt mittels Enzymimmunoassay

Zunächst wurde im Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen das in 2.2 beschriebene Normalkollektiv getestet. Hierbei wurden Serumverdünnungen von 1:20 in PBS untersucht. Anhand der in 2.10 beschriebenen Formel wurde die Inhibition (%) in Bezug auf einen Pool mehrerer lebergesunder Normalpersonen berechnet. Anhand dieser Ergebnisse wurde dann der Positiv- und Negativbereich für die Antikörperbestimmung berechnet.

Ergebnisse des Normalkollektivs:

n = 106

Mittelwert der Inhibition: -15,7%

Standardabweichung: 10,7%

Mittelwert plus dreifache Standardabweichung: 16,3%

Eine Inhibition von 20% wurde als Grenze ausgewählt zur Unterscheidung zwischen AMA-M 2 positiven und negativen Seren, so daß folgende Kriterien Anwendung fanden:

Inhibition größer als 20%: Serum ist AMA-M 2 positiv

Inhibition kleiner als 20%: Serum ist AMA-M 2 negativ

Mit diesen Kriterien wurde das Patientenkollektiv untersucht, eine Darstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 3.2.1 gezeigt. Bei Seren, die positiv reagierten, wurde eine Titerbestimmung durchgeführt.

Das Patientenkollektiv wurde gleichzeitig zum Vergleich mittels des RIA auf AMA-M 2 und mittels des IFT auf AMA untersucht.

Klinische und immunologische Befunde der Patienten, deren Seren in einem der drei Tests AMA-positiv reagierten, sind in Tabelle 3.2.2 dargestellt.

Tab. 3.2.1 Inzidenz von Antikörpern gegen Mitochondrien, nachgewiesen mit Immunfluoreszenztest (IFT), sowie gegen das mitochondriale M 2-Antigen, nachgewiesen mit Radiolimmunoassay (RIA) und Enzymimmunoassay (ELISA)

Diagnose	n	Antimitochondriale Antikörper		
		IFT	RIA	ELISA
Primär biliäre Zirrhose	58	57	57	57
Chronisch aktive Hepatitis				
– HBsAg-positiv	21	0	0	0
– HBsAg-negativ	30	4	4	5
Leberzirrhose	22	0	0	0
Akute Hepatitis	17	0	0	0
Primäres Leberzellkarzinom	2	0	0	0
Chronische Non-A-Non-B-Hepatitis	7	0	0	0
Zytomegalie-Virus-Infektion	2	0	0	0
Extrahepatische Cholestase	9	0	0	0
Morbus Wilson	2	0	0	0
Eitrige Cholangitis	1	0	0	0
Leberzyste	1	0	0	0
Toxischer Leberparenchym-schaden	6	0	0	0
Gesunder HBsAg-Träger	1	0	0	0
Lupus erythematodes disseminatus	23	2	0	0
Lichen ruber	2	0	0	0
Glomerulonephritis	20	0	0	0
Rheumatoide Arthritis	24	0	0	0
Morbus Reiter	1	0	0	0
Morbus Crohn	3	0	0	0
Morbus Gilbert-Meulengracht	1	0	0	0
Autoimmunhämolytische Anämie	1	0	0	0
Polychondritis	1	0	0	0
Kryoglobulinämie	1	0	0	0
Lues II	1	1	0	0
Endokarditis	1	1	0	0
Normalpersonen	106	0	0	0
Gesamt	364			

Tab. 3.2.2 Klinische und immunologische Daten der Patienten, deren Seren in mindestens einem der drei Tests zur Bestimmung antimito-
chondrialer Antikörper (IFT, RIA, ELISA) positiv reagiert haben.

Nr.	Diagnose	Alter	Geschlecht	AMA, nachgewiesen mit			andere Autoantikörper:							
				IFT	RIA	ELISA	ANA	SMA	TAK	MAK	RF	LMA		
													(reziproke Titer)	
1	PBC	55	w	320	62500	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
2	PBC	n.b.	w	320	7.8 Mio	12500	+	-	-	-	-	-	-	-
3	PBC	67	w	320	12500	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
4	PBC	43	w	160	1.5 Mio	12500	-	-	-	-	+	-	-	-
5	PBC	75	w	320	1.5 Mio	2500	-	-	-	+	+	+	-	-
6	PBC	57	w	80	312000	2500	-	-	-	-	+	-	-	-
7	PBC	n.b.	m	20	12500	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
8	PBC	48	w	160	62500	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
9	PBC	38	w	320	312500	2500	+	-	-	-	-	-	-	-
10	PBC	63	m	640	2500	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
11	PBC	77	w	2560	156250	12500	-	-	-	+	+	+	-	-
12	PBC	62	w	40	12500	2500	-	-	-	-	+	-	-	-
13	PBC	67	w	80	2500	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
14	PBC	52	w	640	256000	62500	-	-	-	-	-	-	-	+
15	PBC	n.b.	w	40	+	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
16	PBC	47	w	40	+	500	-	-	-	-	-	-	-	-
17	PBC	78	w	80	40	20	+	-	-	-	-	-	-	-
18	PBC	46	w	80	100	2500	-	-	-	-	-	-	-	-
19	PBC	n.b.	w	640	+	12500	-	-	-	-	-	+	-	-
20	PBC	n.b.	m	320	1.0 Mio	62500	-	-	-	-	-	+	-	-
21	PBC	46	w	80	+	62500	-	-	-	-	-	+	-	-
22	PBC	54	m	320	256000	2500	-	-	-	-	-	-	-	-
23	PBC	48	w	160	+	2500	-	-	-	-	-	-	-	-
24	PBC	35	w	160	16000	2500	-	-	-	-	-	-	-	-
25	PBC	61	m	320	1.0 Mio	12500	-	-	-	-	-	-	-	-
26	PBC	55	w	+	+	500	-	-	-	-	-	-	-	-
27	PBC	52	w	+	+	2500	-	-	-	-	-	-	-	-
28	PBC	38	w	+	+	62500	-	+	-	-	-	-	-	-
29	PBC	42	w	320	+	12500	-	-	-	+	+	-	-	-
30	PBC	54	w	160	64000	2500	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 3.2.2 Fortsetzung

Nr.	Diagnose	Alter	Geschlecht	AMA, nachgewiesen mit IFT	AMA, nachgewiesen mit		andere Autoantikörper:					
					RIA (reziproke Titer)	ELISA	ANA	SMA	TAK	MAK	RF	LMA
31	PBC	n.b.	n.b.	320	1.0 Mio	12500	-	-	-	-	-	-
32	PBC	n.b.	w	10	16000	2500	-	-	-	-	-	-
33	PBC	72	w	+	+	2500	-	-	+	-	-	-
34	PBC	67	w	10	+	62500	-	-	-	-	-	-
35	PBC	69	w	+	+	20	-	-	-	-	-	-
36	PBC	69	w	20	+	62500	-	-	-	-	-	-
37	PBC	52	w	+	+	12500	-	-	-	-	-	-
38	PBC	46	w	+	+	12500	-	-	-	+	-	-
39	PBC	50	m	+	+	12500	-	-	-	-	-	-
40	PBC	58	w	+	+	500	-	-	-	-	-	-
41	PBC	57	m	+	+	500	-	-	-	-	-	-
42	PBC	48	w	+	+	12500	-	-	-	-	-	-
43	PBC	75	w	+	+	2500	+	-	-	-	-	-
44	PBC	64	w	+	+	500	-	-	-	-	-	-
45	PBC	62	w	+	+	12500	+	-	+	+	-	-
46	PBC	39	w	+	+	2500	-	-	-	-	-	-
47	PBC	56	w	160	+	2500	-	-	-	-	+	-
48	PBC	50	w	+	+	12500	-	+	-	-	-	-
49	PBC	65	m	+	+	12500	-	-	-	-	+	-
50	PBC	80	w	+	-	100	-	-	-	-	-	-
51	PBC	n.b.	n.b.	+	+	62500	-	-	-	-	-	-
52	PBC	61	w	+	64000	12500	-	-	-	-	-	-
53	PBC	66	w	+	+	2500	-	+	-	-	-	+
54	PBC	73	w	+	+	2500	-	-	-	-	-	-
55	PBC	80	w	+	+	2500	-	-	+	+	-	-
56	PBC	60	w	+	+	2500	-	-	-	-	-	-
57	PBC	43	w	+	+	12500	-	-	-	-	-	-
58	PBC	56	w	-	+	-	+	-	+	-	-	-
59	CAH	66	w	20	1280	500	+	+	-	-	+	-
60	CAH	38	w	40	+	2500	-	+	+	-	-	-

Tab. 3.2.2 Fortsetzung

Nr.	Diagnose	Alter	Geschlecht	AMA, nachgewiesen mit		ELISA	andere Autoantikörper:					
				IFT	RIA (reziproke Titer)		ANA	SMA	TAK	MAK	RF	LMA
61	CAH	56	w	+	+	62500	+	+	-	-	-	-
62	CAH	41	w	+	+	2500	-	-	-	+	-	-
63	CAH	69	w	-	-	100	-	-	-	+	-	-
64	Endokard.	38	w	+	-	-	-	-	-	-	-	-
65	LED	23	w	+	-	-	+	-	-	-	-	-
66	LED	29	w	+	-	-	+	-	-	-	-	-
67	Lues II	26	m	+	-	-	-	-	-	-	-	-

n.b. = nicht bekannt

+ = positiver Nachweis (keine Titerbestimmung durchgeführt)

- = negativ

Weiterhin wurden Seren untersucht, die andere Autoantikörper enthielten. Diese Seren waren negativ im AMA-M 2-RIA und im Enzymimmunoassay. Sie sind in Tabelle 3.2.3 dargestellt.

Es wird somit gezeigt, daß Autoantikörper anderer Spezifität nicht mit dem Testsystem interferieren.

Tab. 3.2.3 Seren mit Autoantikörpern anderer Spezifität, die im AMA-M 2 Enzymimmunoassay negativ reagierten.

Antikörper	Anzahl
MAK	34
TAK	5
ANA	15
SMA	8
LMA	4
ENA	1
RF	12
Immunkomplexe	3
Gesamt	82

3.3 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Testsysteme

3.3.1 Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens

Die Untersuchungen zur Intra- und Interassay-Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens brachten die in Tabelle 3.3.1 dargestellten Ergebnisse.

Der Intraassay-Variationskoeffizient betrug 3,2%, der Interassay-Variationskoeffizient 4,6%. Der Test erwies sich somit als reproduzierbar.

Tab. 3.3.1 Untersuchungen zur Intra- und Interassay-Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens

Probe Nr.	Intraassay-Bestimmung Extinktion bei 414 nm	Interassay-Bestimmung Extinktion bei 414 nm
1	1,50	1,59
2	1,52	1,50
3	1,58	1,57
4	1,52	1,50
5	1,51	1,41
$\bar{x}$	1,55	1,52
s	0,05	0,07
V	3,2%	4,6%

3.3.2 Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen

Die Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Testsystems wurden mit jeweils fünf Seren (drei Positiv-, zwei Negativseren) durchgeführt. Wie Tabelle 3.3.2 zeigt, liegen die Variationskoeffizienten für die Intraassaybestimmung zwischen 0,7 % und 5,5%, für die Interassaybestimmung zwischen 3,8% und 5,5%. Das Testsystem zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen ist somit reproduzierbar.

Tab. 3.3.2 Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit des Enzymimmunoassays zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen

a) Intraassay-Reproduzierbarkeit:

Serum-Nr.	% Inhibition					$\bar{x}$	s	V
	1	2	3	4	5			
1	80,1	81,4	81,3	81,5	80,7	81,0	0,6	0,7%
2	70,4	66,1	65,7	66,2	67,6	67,6	1,9	2,8%
3	70,0	66,1	67,0	68,1	75,6	69,4	3,8	5,5%
4	-26,0	-24,8	-27,7	-29,6	-27,4	-27,1	1,8	
5	-27,0	-23,7	-20,3	-18,1	-23,8	-22,6	3,4	

b) Interassay-Reproduzierbarkeit:

Serum-Nr.	% Inhibition					$\bar{x}$	s	V
	1	2	3	4	5			
6	81,2	91,9	81,6	82,9	81,0	83,7	4,6	5,5%
7	92,3	99,7	94,6	91,8	98,8	95,4	3,6	3,8%
8	90,9	97,8	89,4	90,9	88,4	91,5	3,7	4,0%
9	-6,2	-4,5	-3,7	-4,4	-0,9	-3,9	1,9	
10	-10,1	-11,0	-12,5	-17,5	-17,5	-13,7	3,6	

3.4 Nachweis von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen in der Immunglobulinklasse M

Es wurde versucht, mit den drei verschiedenen, in 2.11 beschriebenen Enzymimmunoassays, spezifisch Antikörper der Immunglobulinklasse IgM nachzuweisen.

Bei diesen Ansätzen wurden jeweils verdünnte Seren von PBC-Patienten und Normalpersonen eingesetzt. Es konnten hierbei jedoch keine Unterscheidungen zwischen AMA-M 2 positiven PBC-Seren und Normalseren getroffen werden. Ein spezifischer Nachweis von AMA-M 2 der Immunglobulinklasse IgM mit diesen Methoden war somit nicht möglich.

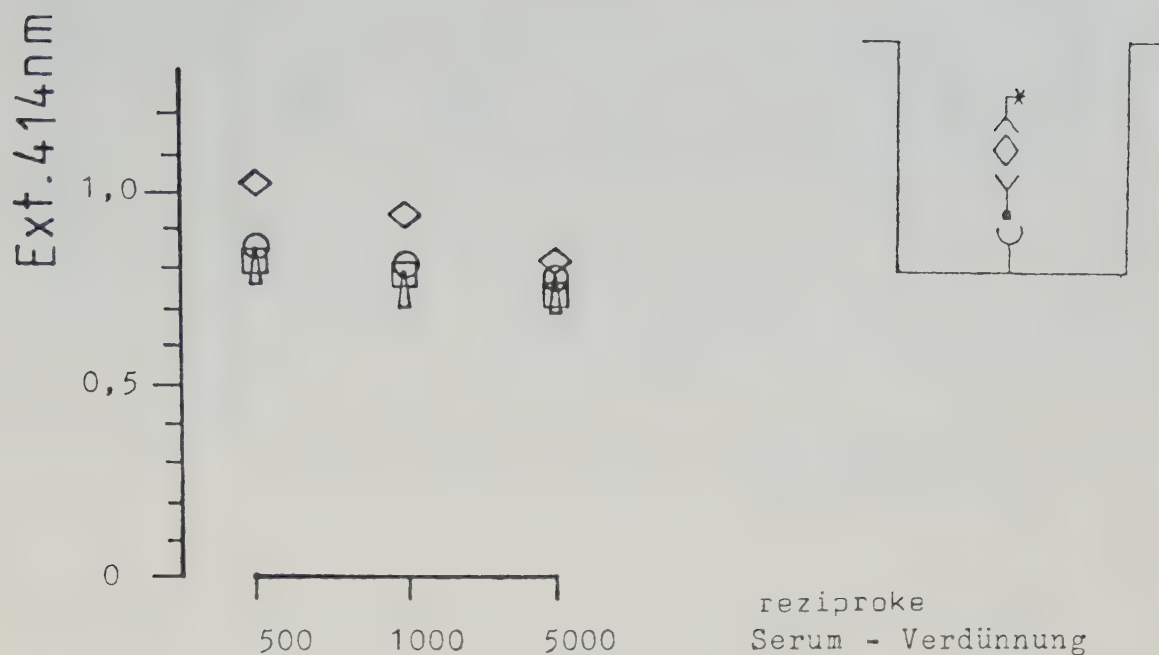


Abb. 3.4.1 Beispiel einer Untersuchung von vier Seren (zwei AMA-M 2-positive Seren, zwei AMA-M 2-negative Kontrollseren) mit dem Enzymimmunoassay I (2.11.1; 'antibody-capture-method') auf AMA-M 2-IgM.

Beschichtung: Anti-Human-IgM 10µg/ml, Seren verdünnt in PBS, RLMI 1 mg/ml, AMA-IgG-Peroxidase-Konjugat 12,5µg/ml, 50 mM ABTS + 0,0025% H_2O_2 .

- ◇ ○ AMA-positive Seren
- ▴ AMA-negative Seren

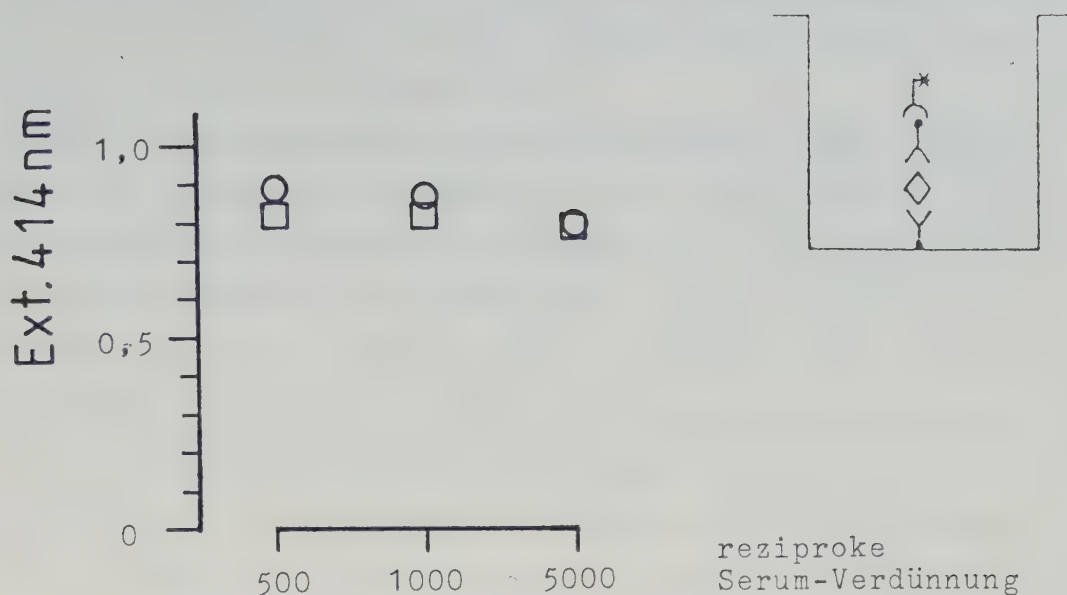


Abb. 3.4.2 Beispiel einer Untersuchung zweier Seren (ein AMA-M 2-positives Serum, ein AMA-M 2-negatives Kontrollserum) im Enzymimmunoassay II (2.11.1) auf AMA-M 2-IgM.
Beschichtung: Referenz-IgG 0,1mg/ml, RLMI 1mg/ml, Seren verdünnt in PBS, Anti-Human-IgM verdünnt in 1% BSA-PBS 1:500.

- AMA-M 2-positives Serum
- AMA-M 2-negatives Serum

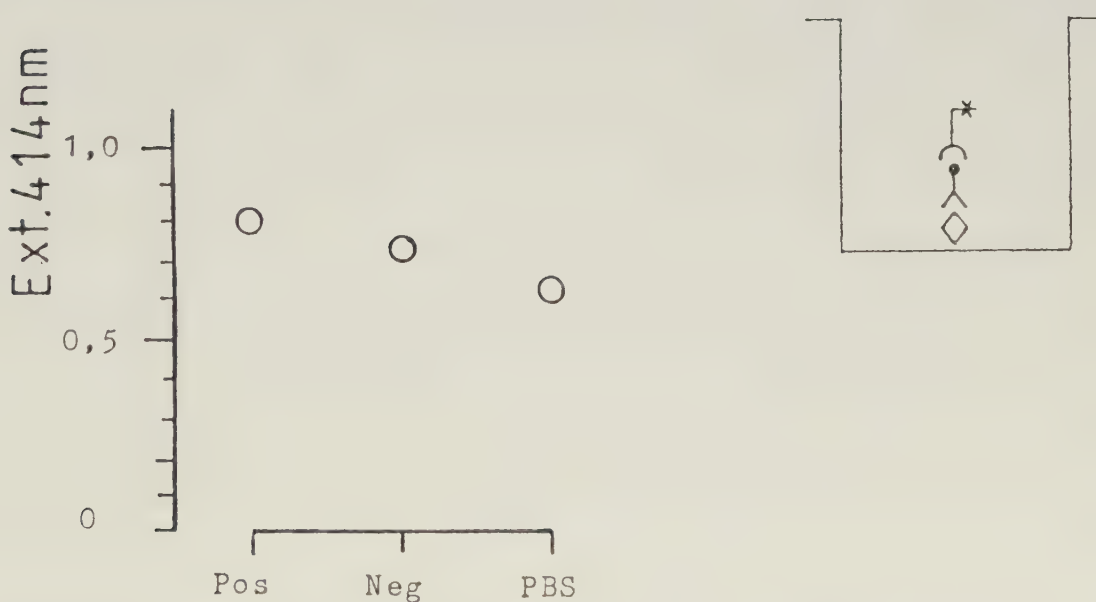


Abb. 3.4.3 Beispiel einer Untersuchung eines AMA-M 2-positiven Serums sowie eines AMA-M 2-negativen Kontrollserums sowie einer PBS-Negativkontrolle im Enzymimmunoassay III (2.11.1) auf AMA-M 2-IgM.
Beschichtung: RLMI 1mg/ml, Seren 1:500 in PBS, Anti-Human-IgM 1:500 in 1% BSA-PBS.

Der Nachweis antimitochondrialer Antikörper der Immunglobulinklasse IgM gelang bei der Untersuchung der durch Sephacryl S-300 Gelfiltration gereinigten IgM-Fraktion der Testseren (2.11.2).

In Fraktionen, in denen mit der radialen Immundiffusion nach Mancini nur IgM, nicht aber IgG oder IgA nachgewiesen werden konnte, wurde der Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen durchgeführt. Dabei ergab sich in 15 von 20 getesteten IgM-Fraktionen von AMA-M 2 positiven Seren eine positive Reaktion, d.h. es wurde eine Inhibition von größer als 20% festgestellt.

Bei fünf auf die gleiche Weise präparierten IgM-Fraktionen von Normalseren mit gleicher Proteinkonzentration trat keine positive Reaktion auf.

Die Fraktionen, die mit einer Inhibition von größer als 20% positiv reagiert hatten, wurden in einer Versuchsreihe weiter untersucht, um die Konzentration zu bestimmen, die bei diesem Serum im Enzymimmunoassay noch positiv reagierte. Die Einstellung der verschiedenen IgM-Fraktionen auf eine einheitliche Konzentration war aufgrund der geringen Mengen, die gewonnen werden konnten, nicht möglich. Daher wurde für jede Verdünnungsstufe die Konzentration an IgM anhand der in der radialen Immundiffusion erhaltenen IgM-Konzentrationen errechnet.

Die Ergebnisse dieser Konzentrationsbestimmung sowie die Konzentration von IgM, IgG, IgA, alkalischer Phosphatase sowie SGPT in den entsprechenden Seren zeigt die Tabelle 3.4.1.

Tab. 3.4.1 Nachweis der AMA-M 2-Aktivität in gereinigten IgM-Fractionen von 20 Patienten mit primär biliärer Zirrhose

Serum-Nr.	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)	AP (U/l)	SGPT (U/l)	geringste AMA-M2- positive IgM-Kon- zentration (µg/dl)
1	1539	865	173	888	63	32
2	2570	261	282	268	18	neg.
3	1092	720	164	339	149	neg.
4	3340	510	330	1101	20	neg.
5	1147	752	261	298	24	3,7
6	2036	1120	173	296	20	6,5
7	1565	960	401	n.u.	n.u.	28,5
8	2045	552	242	n.u.	n.u.	11,8
9	2828	1524	331	720	50	1,4
10	1260	720	290	n.u.	n.u.	3,2
11	1227	434	151	476	26	3,5
12	1731	731	250	n.u.	n.u.	3,6
13	1420	660	269	588	41	12,5
14	1520	246	310	240	17	neg.
15	1150	710	253	584	38	9,5
16	1205	1160	148	273	17	101
17	2120	204	118	118	9	neg.
18	808	460	307	n.u.	n.u.	3,7
19	1675	291	384	1197	84	7,9
20	1563	460	345	n.u.	n.u.	10,5

Die geringste jeweils noch positiv reagierende IgM-Konzentration wurde mit dem Gehalt an IgM und IgG im Patientenserum sowie der alkalischen Phosphatase (AP) und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT) im jeweiligen Serum verglichen.

Die Untersuchungen dieser Korrelationen sind in den Abbildungen 3.4.4 bis 3.4.7 dargestellt.

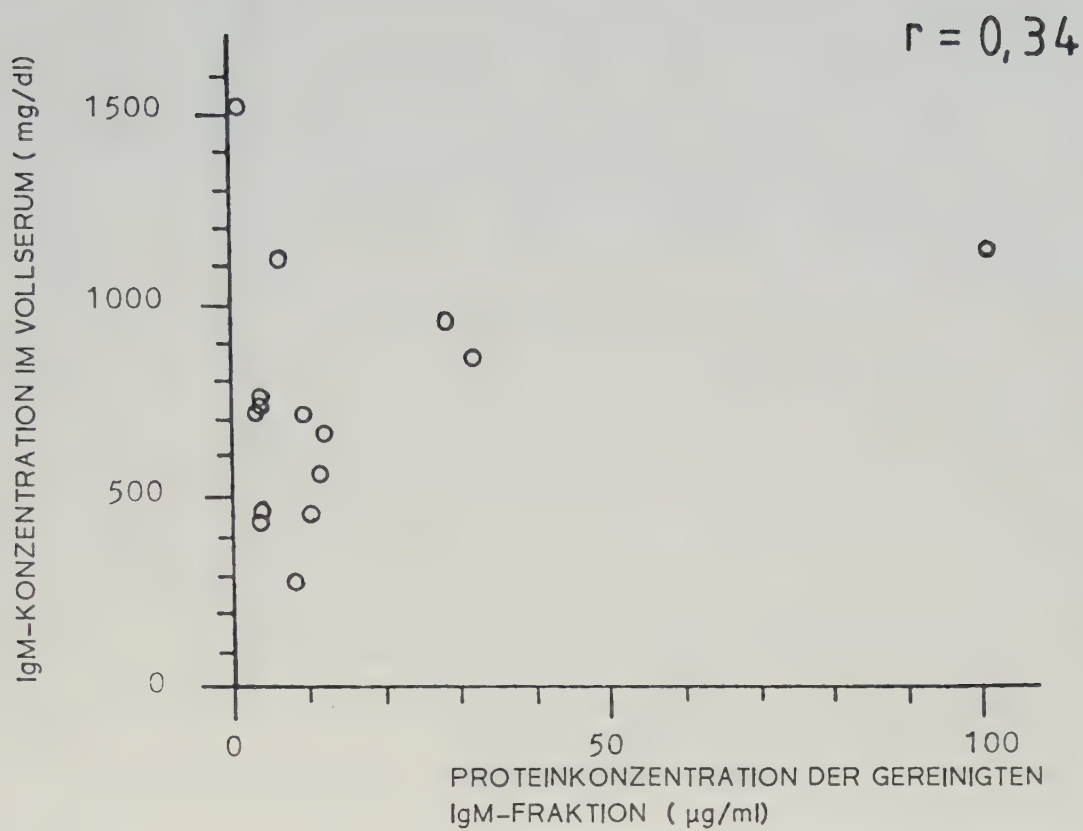


Abb. 3.4.4 Untersuchung der Korrelation des Serumspegels von IgM mit der geringsten noch AMA-M 2-positiv reagierenden IgM-Konzentration

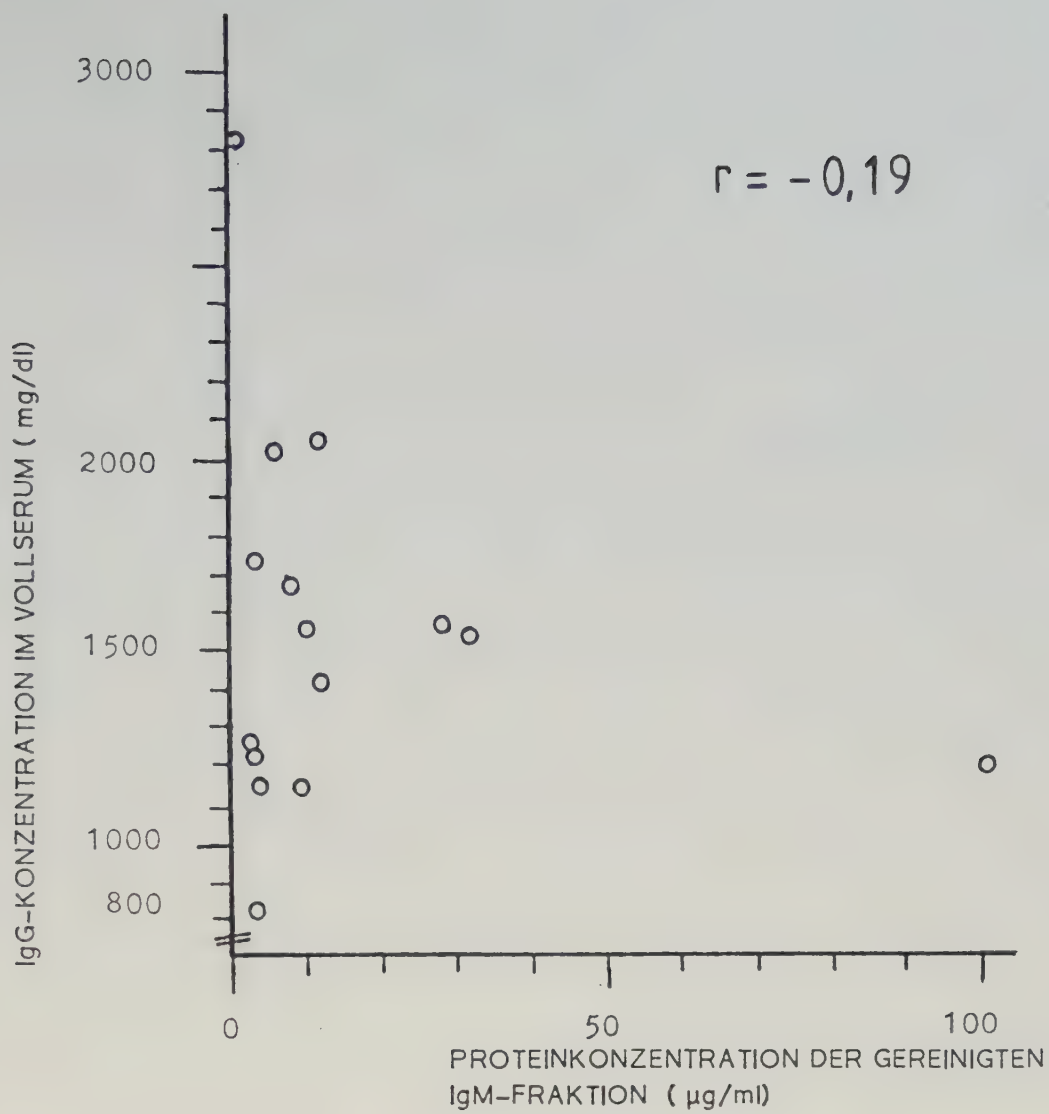


Abb. 3.4.5 Untersuchung der Korrelation des Serumspiegels von IgG mit der geringsten noch AMA-M 2-positiv reagierenden IgM-Konzentration

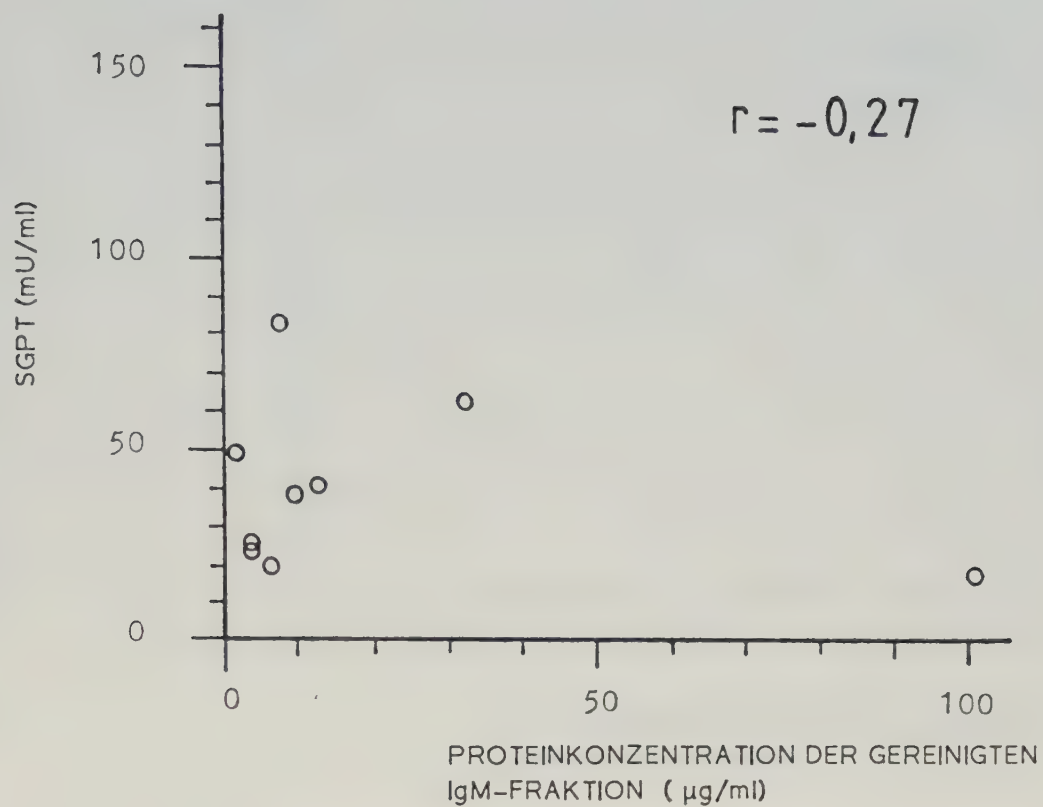


Abb. 3.4.6 Untersuchung der Korrelation der Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (SGPT) mit der geringsten noch AMA-M 2-positiv reagierenden IgM-Konzentration

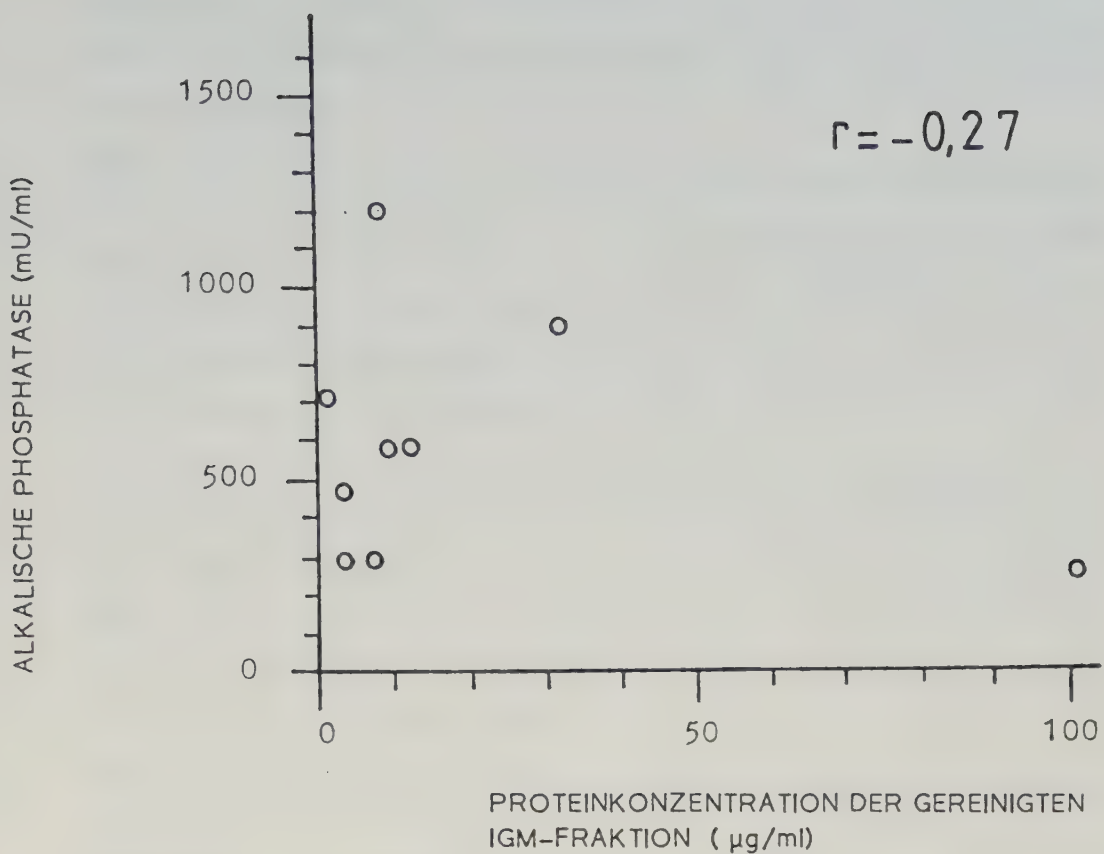


Abb. 3.4.7 Untersuchung der Korrelation der alkalischen Phosphatase (AP) mit der geringsten noch AMA-M 2-positiv reagierenden IgM-Konzentration

Die Korrelationskoeffizienten (r) ergaben 0,34 mit dem Serumspiegel von IgM, -0,19 mit dem Serumspiegel von IgG sowie -0,27 mit der SGPT und -0,27 mit der AP. Somit korrelierten AMA-M 2-IgM-Spiegel nicht mit dem quantitativen Gehalt der jeweiligen Seren an IgM und IgG und ebenfalls nicht mit der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der SGPT als Maß für die biochemische Aktivität der Erkrankung.

4. DISKUSSION

Schon Walker et al. 1965 beschrieben, daß sich eine zytoplasmatische Fluoreszenz von Seren von PBC-Patienten am deutlichsten mit mitochondrialen Geweben darstellt. Die stärkste Reaktion wurde mit Zellen des Nierenmarkes beobachtet.

Berg et al. 1967 wiesen nach, daß diese Antikörper gegen Mitochondrien gerichtet sind, wobei das Antigen gehäuft in Mitochondrien mit dicht gepackten Cristae nachgewiesen werden konnte. In späteren Arbeiten wurde dann das M 2-Antigen genauer charakterisiert als trypsin-sensitives, ATPase-assoziiertes Antigen der inneren Mitochondrienmembran (Berg et al. 1967, Berg et al. 1969a, Berg et al. 1980a, Manns et al. 1982).

Eine Kreuzreaktion der AMA-M 2 mit Zellmembranen und Mitochondrien bestimmter Mikroorganismen, besonders Protozoen und Hefen, wurde von Berg et al. 1980a sowie Baum et al. 1981 beschrieben. Daneben diskutierten sie auch, daß die antimitochondrialen Antikörper durch einen kreuzreagierenden Mikroorganismus bedingt sein könnten und somit einen Hinweis auf ein ätiologisches Agens bieten könnten.

Mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Enzymimmunoassay zur Bestimmung des mitochondrialen M 2-Antigens wurde eine Methode entwickelt, gereinigte Mitochondrien aus unterschiedlichen Organen verschiedener Spezies auf ihren Gehalt an M 2-Antigen zu untersuchen.

Dabei konnte das mitochondriale M 2-Antigen bei allen fünf untersuchten Spezies (Mensch, Ratte, Kaninchen, Meerschweinchen und Maus) in nahezu allen untersuchten Organen nachgewiesen werden. Dabei wurden in unterschiedlichen Organen verschiedene Extinktionswerte erzielt. Dies könnte zum einen am unterschiedlichen Gehalt der Gewebe an Mitochondrien mit dicht gepackten Cristae liegen, daneben auch an der unterschiedlichen Struktur der Organe und Gewebe, so daß die Freisetzung der Mitochondrien bei der Präparation nicht immer im gleichen Maße gelang.

Dieser Enzymimmunoassay bietet nun die Möglichkeit, weitergehende Untersuchungen über das Vorkommen des mitochondrialen M 2-Antigens durchzuführen, zum Beispiel über das Vorkommen dieses Antigens in kreuzreagierenden Mikroorganismen.

Die Untersuchungen mit dem Enzymimmunoassay zur Bestimmung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen korrelieren mit dem von Manns et al. 1982 beschriebenen Radioimmunoassay. Bei 57 von 58 Patienten mit primär biliärer Zirrhose konnten AMA-M 2 nachgewiesen werden.

In einem Fall wurden AMA-M 2 nur mittels Radioimmunoassay nachgewiesen. In einem anderen Fall ergab sich nur ein Nachweis im Immunfluoreszenztest und dem Enzymimmunoassay mit niedrigem Titer, während das Ergebnis im RIA negativ war.

AMA-M 2 konnten in fünf Fällen von HBsAg-negativer chronisch aktiver Hepatitis nachgewiesen werden. Berg et al. 1975 und 1980b beschrieben eine Mischform zwischen der chronisch aktiven Hepatitis und der primär biliären Zirrhose, bei der diejenigen histologischen Läsionen vorkommen, welche für die CAH typisch sind, daneben aber auch die für die PBC typischen Granulome und Gallengangsproliferationen. Hierbei konnten sowohl antimitochondriale Antikörper gegen das M 2-Antigen als auch gegen das M 4-Antigen nachgewiesen werden, außerdem sind gleichzeitig die Serumspiegel der Immunglobuline IgM und IgG erhöht.

In 46 weiteren Fällen von chronisch aktiver Hepatitis konnten keine AMA-M 2 nachgewiesen werden, ebenso nicht bei 70 Patienten mit verschiedenen anderen Lebererkrankungen. Diese Seren waren im Radioimmunoassay mit negativem Ergebnis getestet worden, so daß hier eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse vorlag.

Bei zwei Patienten mit Lupus erythematodes disseminatus, einem Patienten mit Lues II sowie einem Patienten mit Endokarditis konnte nur im Immunofluoreszenztest antimitochondriale Antikörper nachgewiesen werden, aber keine AMA-M 2 im Radioimmunoassay oder Enzymimmunoassay. Vermutlich handelt es sich hierbei um Antikörper gegen andere mitochondriale Antigene, z.B. bei Lues gegen das mitochondriale M 1-Antigen, entsprechend dem Cardiolipin.

Eine Beeinflussung des Testsystems durch Antikörper anderer Spezifität konnte ausgeschlossen werden. Bei 82 untersuchten Seren mit verschiedenen Autoantikörpern wurde im Enzymimmunoassay keine Positivreaktion festgestellt.

Der Enzymimmunoassay zur Untersuchung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen bietet eine Alternative zum bisher angewendeten Radioimmunoassay. Der Enzymimmunoassay weist ebenfalls spezifisch Antikörper gegen das M 2-Antigen nach. Ein großer Vorteil in der Anwendung des Enzymimmunoassays liegt darin, daß die Besonderheiten der Strahlenschutzbestimmungen nicht berücksichtigt werden müssen. Ein Enzymimmunoassay ist praktisch in jedem Labor durchführbar. Außerdem sind die mit Peroxidase gekoppelten Antikörper länger haltbar. Schuurs et al. 1977 beschreiben eine Lagerdauer ohne Aktivitätsverlust von über drei Jahren. Der hier beschriebene Enzymimmunoassay läßt sich außerdem innerhalb von 24 Stunden durchführen.

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode, um die Bedeutung der AMA-M 2 in der Klasse der IgM-Immunglobuline im Serum bei der primär biliären Zirrhose zu untersuchen. Ein wichtiges diagnostisches Kriterium bei der PBC ist die Erhöhung der IgM-Immunglobuline im Serum, die Ursache dieses Phänomens ist nicht mit letzter Sicherheit geklärt. Es wird die fehlende Konversion von IgM zu IgG im Rahmen der Synthese der Immunglobuline diskutiert (Fakunle et al. 1978).

Diese hohen IgM-Immunglobulinspiegel werden auch für die Bildung von Immunkomplexen bei der PBC ursächlich angenommen, wobei ein weiteres Charakteristikum bei der PBC die Bildung von Immunkomplexen mit Sedimentationskonstanten von größer als 20 S ist (Thomas et al. 1977). Solche großen Immunkomplexe könnten einen an IgM gebundenen Antigenkomplex enthalten. Auch Wands et al. 1978 beschrieben bei 95% der untersuchten PBC-Seren Immunkomplexe, die aber keine klinischen Bilder einer Immunkomplexkrankheit verursachten. Dies wurde ebenfalls auf die Größe der Immunkomplexe zurückgeführt. Außerdem wiesen Wands et al. in 90% der PBC-Fälle Kryoglobuline nach. Davon bestanden 60% nur aus IgM, 25% aus IgM und IgG, was ebenfalls als ungewöhnlich angesehen wurde. Bei einer Vielzahl anderer Lebererkrankungen und extrahepatischer Krankheitsbilder wurden nur bei einem Patienten Immunkomplexe mit IgM als alleinigem Immunglobulin festgestellt.

Ein Antigen, gegen das diese Antikörper der IgM-Immunglobulinklasse gerichtet sind, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Eine Ähnlichkeit zwischen der primär biliären Zirrhose und der chronischen Graft-versus-host-disease nach Knochenmarkstransplantation wurde beschrieben (Epstein et al. 1980). Hier liegen ebenfalls erhöhte Immunglobulinspiegel von IgM und IgG

im Serum vor. Außerdem wurden auch Läsionen der Gallengänge aufgrund der dort reichhaltig exprimierten HLA-Antigene beschrieben. Dies führte zu der Annahme, daß Antikörper gegen bestimmte HLA-Antigene gerichtet sein könnten. Eine solche Beziehung konnte von McFarlane et al. 1983 nicht nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten klären, inwieweit Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen von der Immunglobulinklasse IgM an dieser IgM-Erhöhung im Serum Anteil haben, bzw. welchen Anteil AMA der Klasse IgM an der Gesamtheit der AMA haben.

Die zunächst durchgeführten verschiedenen Variationen von Enzymimmunoassays, in denen Serumverdünnungen von verschiedenen PBC-Patienten getestet wurden, ergaben keine ausreichende Differenzierung zwischen den AMA-M 2 der IgM-Klasse und dem IgM von Normalpersonen. Es wurde in diesen Enzymimmunoassays versucht, Prinzipien des IgM-Antikörnernachweises aus der Virologie zu modifizieren. Hierbei ist aber die unterschiedliche Zusammensetzung der IgM-Antikörper von großer Bedeutung. Während bei Virusinfektionen in der akuten Phase ein deutlicher Anstieg des IgM gegen einen bestimmten Erreger, d.h. gegen ein bestimmtes Antigen, eintritt, liegen bei der primär biliären Zirrhose wohl nur geringe spezifische IgM-Konzentrationen (AMA-M 2-IgM) vor bei allgemein erhöhtem IgM-Spiegel.

Mit anderen Worten, während z.B. bei akuter Virushepatitis A IgM-Antikörper in der akuten Phase gegenüber IgG Antikörpern überwiegen, scheinen AMA-M 2-IgM nur einen verschwindend geringen Anteil gegenüber AMA-M 2-IgG am gesamten AMA-Spiegel der Patienten zu haben.

Von Bedeutung war hierbei auch, daß kein heterologer Antikörper zur Verfügung stand, der gegen das mitochondriale M 2-Antigen gerichtet ist. Sowohl die zu untersuchenden Testseren und Referenzseren als auch das peroxidase-gekoppelte AMA-M 2 waren humanen Ursprungs. Dies führte bei Testsätzen mit Antikörpern gegen humanes IgM zu starken unspezifischen Reaktionen. Verbesserung könnte hier die Entwicklung eines murinen monoklonalen Antikörpers gegen das mitochondriale M 2-Antigen bewirken, womit dann die Entwicklung eines Enzymimmunoassays mit standardisierten Reagenzien möglich werden könnte.

Erfolgreicher erschien daher die Untersuchung gereinigter IgM-Fraktionen von Patientenseren. Verwertbare Ergebnisse konnten mit der Untersuchung der durch Sephacryl S-300 Gelfiltration gewonnenen IgM-Fraktionen erzielt werden. Bei 15 von 20 untersuchten Seren von PBC-Patienten konnten

Antikörper der IgM-Klasse gegen das mitochondriale M 2-Antigen nachgewiesen werden, nicht aber bei den untersuchten IgM-Fractionen von fünf Normalseren.

Die in einer Titerbestimmung ermittelten Konzentrationen von AMA-M2-IgM korrelierten weder mit dem Serumspiegeln der Immunglobuline IgM und IgG (Korrelationskoeffizienten $r = 0,34$ bzw. $-0,19$) noch mit der alkalischen Phosphatase oder Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase (Korrelationskoeffizienten $r = -0,27$) als biochemischen Parametern für die Krankheitsaktivität. Die klinische Bedeutung der antimitochondrialen Antikörper gegen das M 2-Antigen in der IgM-Immunglobulin-Klasse muß folglich als gering angesehen werden. Eine Korrelation mit der Histologie ist bisher nicht erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode zum spezifischen Nachweis des AMA-Subtyps M 2 der Immunglobulin-Klasse IgM etabliert. Es besteht die Möglichkeit, mit dem entwickelten Testsystem ein größeres Kollektiv von Seren von Patienten mit primär biliärer Zirrhose zu untersuchen, wenngleich eine klinische Relevanz der AMA-M 2-IgM nicht wahrscheinlich erscheint.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde in dieser Arbeit ein Testsystem zur Untersuchung der Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen der Immunglobulinklasse IgM entwickelt.

Zunächst wurde der von Nagai et al. 1983 beschriebene Enzymimmunoassay modifiziert und optimiert, um Untersuchungen über die Organ- und Spezies-Spezifität des mitochondrialen M 2-Antigens durchzuführen. Hierbei wurde das M 2-Antigen bei allen untersuchten Spezies nachgewiesen.

Anschließend erfolgte die Untersuchung eines Patientenkollektives mit einem Enzymimmunoassay zur Bestimmung der Inzidenz von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen. AMA-M 2 wurden bei 57 von 58 Patienten mit primär biliärer Zirrhose und bei 5 von 58 Patienten mit chronisch aktiver Hepatitis festgestellt. Kein AMA-M 2-Nachweis gelang bei 70 Patienten mit anderen Lebererkrankungen, 79 Patienten mit anderen Erkrankungen sowie 106 Normalpersonen.

Die beiden obigen Testsysteme erwiesen sich als reproduzierbar.

Zur Untersuchung der AMA-M 2 in der Immunglobulinklasse IgM wurden zunächst verschiedene Methoden von Enzymimmunoassays aus der Virologie modifiziert getestet. Dabei wurden Patientenserum direkt eingesetzt. Es ergab sich kein spezifischer AMA-M 2-IgM-Nachweis.

Daher wurde die IgM-Fraktion von Patientenserum mit Sephacryl S 300 Gelfiltration abgetrennt und im Enzymimmunoassay zur Untersuchung von Antikörpern gegen das mitochondriale M 2-Antigen getestet. Bei 15 von 20 untersuchten Seren von PBC-Patienten konnten spezifische AMA-M 2 der Immunglobulinklasse IgM nachgewiesen werden. Die dabei erzielten Titer wurden mit den Serumspiegeln von IgM, IgG, alkalischer Phosphatase und SGPT verglichen. Die Titer korrelierten nicht mit den Spiegeln von IgM oder IgG, so daß die AMA-M 2-IgM keinen signifikanten Anteil an den hohen IgM-Spiegeln bei der PBC stellen. Auch korrelierten sie nicht mit der Aktivität der alkalischen Phosphatase oder SGPT als Parameter der Krankheitsaktivität, sodaß die klinische Bedeutung der AMA-M 2-IgM gering eingeschätzt wird.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-äthyl-benzthiazolin-6-sulfonsäure)-(NH ₄) ₂ -Salz
AMA	Antimitochondriale Antikörper
AMA-M 2	Antikörper gegen das mitochondriale M 2-Antigen
ANA	Antikörper gegen Kerne
Anti-HAV	Antikörper gegen das Hepatitis A-Virus
Anti-HBc	Antikörper gegen das Hepatitis B core Antigen
Anti-HBs	Antikörper gegen das Hepatitis B surface Antigen
BSA	Rinder-Serum-Albumin
CAH	Chronisch aktive Hepatitis
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ENA	Extracted nuclear antigen
Ext.	Extinktion
HBsAg	Hepatitis B Oberflächen Antigen (surface-antigen)
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
IFT	Immunfluoreszenztest
Konz.	Konzentration
LED	Lupus erythematoses disseminatus
LMA	Leber-Membran-Antikörper
MAK	Antikörper gegen Schilddrüsen-Mikrosomen
m	männlich
NHS	Normalhumanserum
PBC	Primär biliäre Zirrhose
PBS	0,01M Kaliumphosphatpuffer mit 0,15M NaCl, pH 7,5
r	Korrelationskoeffizient
RF	Rheumafaktor
RIA	Radioimmunoassay
RLMI	Mitochondrien aus Rattenleber
RT	Raumtemperatur
s	Standardabweichung
SGPT	Serum-Glutamat-Pyruvat-Transaminase
SMA	Antikörper gegen glatte Muskulatur
TAK	Antikörper gegen Thyreoglobulin
Transm.	Transmission

Tween-PBS

Lösung von Tween 20 (Merck, Darmstadt) in
PBS

V

Variationskoeffizient

w

weiblich

$\bar{x}$

Mittelwert

7. LITERATURVERZEICHNIS

ABU-ELZEIN, E.M.E., CROWTHER, J.R.:

Detection and quantification of IgM, IgA, IgG₁, IgG₂ antibodies against foot- and - mouth disease virus from bovine sera using an enzyme-linked immunosorbent assay
J.Hyg. 86, 79-85 (1981)

BAUM, H., BERG, P.A.:

The complex nature of mitochondrial antibodies and their relation to primary biliary cirrhosis
Sem. Liver Dis. 1, 309-321 (1981)

BERG, P.A., DONIACH, D., ROITT, I.M.:

Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
I. Localisation of the antigen to mitochondrial membranes
J.Exp.Med. 126, 277-293 (1967)

BERG, P.A., ROITT, I.M., DONIACH, D., HORNE, R.W.:

Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
III. Characterisation of the inner-membrane complement fixing antigen
Clin. Exp. Immunol. 4, 511-525 (1969a)

BERG, P.A., ROITT, I.M., DONIACH, D., COOPER, H.M.:

Mitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
IV. Significance of membrane structure for the complement fixing antigen
Immunology 17, 281-293 (1969b)

BERG, P.A., BINDER, T., LINDNER, H., BANNASKI, H., MAAS, D., HENNING, H., BRUGEL, H.:

Heterogenität mitochondrialer Antikörper
Dtsch. med. Wschr. 100, 1123-1127 (1975)

BERG, P.A., BAUM, H.:

Serology of primary biliary cirrhosis
Springer Semin. Immunopathol. 3, 355-373 (1980a)

BERG, P.A., SAYERS, T., WIEDMANN, K.H., KLÖPPEL, G., LINDNER, H.:

Serological classification of chronic cholestatic liver disease by the use of two different types of antimitochondrial antibodies
Lancet II 1980b, 1929–32

BERG, P.A.:

Klinik und Immunologie der autoimmunen chronisch aktiven Hepatitis und der primär-biliären Zirrhose
Immun. Infekt. 10, 3–14 (1982a)

BERG, P.A., LINDENBORN-FOTINOS, J., KLEIN, R., KLÖPPEL, W.:

ATPase-associated antigen (M2): marker antigen for serological diagnosis of primary biliary cirrhosis
Lancet Dec 25, 1982b, 1423–1426

BERG, P.A., KLEIN, R., LINDENBORN-FOTINOS, J.:

Antimitochondrial antibodies in primary biliary cirrhosis
J. Hepatology 2, 123–131 (1986)

BODENHEIMER, H.C., SCHAFFNER, F.:

Primary biliary cirrhosis and the immune system
Am.J. Gastroenterol. 72, 285–296 (1979)

CHRISTENSEN, E., CROWE, J., DONIACH, D., POPPER, H., RANCK, L., RODES, J., TYGSTRUP, N., WILLIAMS, R.:

Clinical pattern and course of disease in primary biliary cirrhosis based on an analysis of 236 patients
Gastroenterol. 78, 236–246 (1980)

DUERMEYER, W., VAN DER VEEN, J.:

Specific detection of IgM-antibodies by ELISA, applied in hepatitis A
Lancet II 1978, 684–85

EPSTEIN, O., THOMAS, H.C., SHERLOCK, S.:

Primary biliary cirrhosis is a dry gland syndrome with features of chronic graft-versus-host disease
Lancet I 1980, 1166–68

FAKUNLE, Y.M., ARANGUIBEL, F., DEVILLIERS, D., THOMAS, H.C., SHERLOCK, S.:

Monomeric (7S) IgM in chronic liver disease

Clin. Exp. Immunol. 38, 204-210 (1979)

FEINMAN, S.V., OVERBY, L.R., BERRIS, B., CHAU, K., SCHABLE, CH.A., MAYNARD, J.E.:

The significance of IgM antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B carriers and hepatitis B-associated chronic liver disease

Hepatology 2, 795-799 (1982)

GHIEMI, S., PIZZOCCOLO, G., IACOBELLO, C., ALBERTINI, A., AROSIO, P.:

Methodological effects on the quantitation of serum ferritin by radio- and enzyme-immunoassays

Clin. Chim. Acta 120, 285-294 (1982)

JAMES, O., MACKLON, A.F., WATSON, A.J.:

Primary biliary cirrhosis - a revised clinical spectrum

Lancet I 1981, 1278-81

KLATSKIN, G., KANTOR, F.S.:

Mitochondrial antibody in primary biliary cirrhosis and other diseases

Ann. Int. Med. 77, 533-541 (1972)

LEE, R.G., EPSTEIN, O., JANREGIN, H., SHERLOCK, S., SCHEUER, P.J.:

Granulomas in primary biliary cirrhosis: a prognostic feature

Gastroenterol. 81, 983-986 (1981)

LINDGREN, ST., ERIKSSON, ST.:

IgM in primary biliary cirrhosis. Physicochemical and complement activating properties

J. Lab. Clin. Med. 99, 636-645 (1982)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.:

Protein measurement with the folin phenol reagent

J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MANN, M., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H.:

A mitochondrial antigen-antibody system in cholestatic liver disease detected by radioimmunoassay

Hepatology 2, 1-7 (1982)

MATHIESEN, L.R., FEINSTONE, ST.M., WONG, D.C., SHINHOEJ,P., PURCELL, R.H.:

Enzyme linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A antigen in stool and antibodies to hepatitis A antigen in sera: comparison with solid-phase radioimmunoassay, immune electron microscopy and immune adherence haemagglutination assay
J. Clin. Microbiol. 7, 184-193 (1978)

MCFARLANE, I.G., MCFARLANE, B.M., HAINES, A.J., EDDLESTONE, A.L.W. F., WILLIAMS, R.:

Relationship between primary biliary cirrhosis and chronic graft-versus-host disease: investigation of histocompatibility (HLA) antigenetic determinants in biliary tract antigens
Clin. Sc. 64, 113-116 (1983)

MEEK, F., KHOURY, E.L., DONIACH, D., BAUM, H.:

Mitochondrial antibodies in chronic liver diseases and connective tissue disorders: further characterization of the autoantigens
Clin. Exp. Immunol. 41, 43-54 (1980)

NAGAI, S., MANNS, M., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE, K.-H., DIENES, H.P.:

Detection of mitochondrial antibodies directed against the primary biliary cirrhosis (M2) antigen by an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)
J. Immunol. Methods 60, 77-88 (1983)

ÖSTERMAN, T.M., JUNTUNEN, K.O., GOTHONI, G.D.:

Enzyme immunoassay of estrogen-like substances in plasma, with polyethylene glycol as precipitant
Clin. Chem. 25, 716-718 (1979)

ROLL, J., BOYER, J.L., BARRY, D., KLATSKIN, G.:

The prognostic importance of clinical and histologic features in asymptomatic and symptomatic primary biliary cirrhosis
N. Engl. J. Med. 308, 1-7 (1983)

RIGGIONE, O, STOKES, R.P., THOMPSON, R.A.:

Predominance of IgG 3 subclass in primary biliary cirrhosis
Brit. Med. J. 286, 1015-1016 (1983)

SCHEUER, P.J.:

Primary biliary cirrhosis

Proc. R. Soc. Med. 60, 1257-60 (1967)

SCHUURS, A.H.W.M., VAN WEEMEN, B.K.:

Enzyme-Immunoassay

Clin. Chim. Acta 81, 1-40 (1977)

SHERLOCK, S., SCHEUER, P.J.:

The presentation and diagnosis of 100 patients with primary biliary cirrhosis

N. Engl. J. Med. 289, 674-678 (1973)

SHERLOCK, S.:

Primary biliary cirrhosis: critical evaluation and treatment policies

Scand. J. Gastroenterol. 17, Suppl. 77, 63-74 (1982)

THOMAS, H.C., POTTER, B.J., SHERLOCK, S.:

Is primary biliary cirrhosis an immune complex disease?

Lancet II 1977, 1261-63

THOMAS, H.C., EPSTEIN, O.:

Pathogenetic mechanisms in primary biliary cirrhosis

Springer Semin. Immunopathol. 3, 375-384 (1980)

VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.:

Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice

Bull. World Health Organ. 53, 55-65 (1976)

VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.:

The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Guernsey 1977

VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E.:

Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques

J. Clin. Pathol. 31, 507-520 (1978)

WALKER, J.G., DONIACH, D., ROITT, I.M., SHERLOCK, S.:

Serological tests in diagnosis of primary biliary cirrhosis

Lancet I 1965, 827-31

WANDS, J.R., DIENSTAG, J.L., BHAN, A.K., FELLER, E.R., ISSELBACHER, K.J.:

Circulating immune complexes and complement activation in primary biliary cirrhosis

N. Engl. J. Med. 298, 233-237 (1978)

DANKSAGUNG

Hiermit möchte ich mich bei all denen recht herzlich bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Im Besonderen gilt mein Dank:

Herrn Prof. Dr. Dr. K.H. Meyer zum Büschenfelde für die Überlassung des Themas,

Herrn Priv.-Doz. Dr. M. Manns für die gute Betreuung und Hilfsbereitschaft bei der Versuchsplanung und -durchführung sowie bei der Abfassung der Arbeit,

Herrn Dr. S. Nagal für die Einweisung in die ELISA-Techniken,

Frau U. Dang für die bereitwillige technische Beratung,

und

Herrn Prof. Dr. G. Hommel für die freundliche statistische Betreuung.

LEBENS LAUF

Am 20.10.1958 wurde ich in Koblenz geboren. Meine Eltern sind der Dipl.-Ing. für Weinbau und Kellereiwirtschaft Robert Merz und seine Frau Elfriede, geb. Degen.

Nach dem Besuch der Volksschule Güls von 1965 bis 1968 und danach des Staatlichen Eichendorff-Gymnasiums Koblenz legte ich am 2.6.1976 die vorzeitige Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 76/77 studierte ich ein Semester Chemie an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz.

Vom 1.4.77-31.3.79 leistete ich meinen Wehrdienst im Sanitätsdienst der Bundeswehr.

Mit dem Sommersemester 1979 begann ich mein Medizinstudium an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz. Hier legte ich am 23.3.81 die ärztliche Vorprüfung, am 25.3.82 den ersten Abschnitt und am 20.3.84 den zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung ab.

Vom 24.4.84 bis 23.3.85 leistete ich das Praktische Jahr im Krankenhaus Kemperhof, Koblenz, ab mit den Fächern Innere Medizin, Chirurgie und Pädiatrie. Darauf folgte am 10.4. und 26.4.85 der dritte Abschnitt der ärztlichen Prüfung. Im Mai 1985 wurde mir dann die Approbation als Arzt erteilt.

Vom 1.6.85 bis 31.1.86 war ich als Assistenzarzt in der Dryander-Klinik, Bad Ems, in der Abteilung Orthopädie/Sportmedizin/physikalische Therapie tätig. Seit dem 1.2.86 arbeite ich als Assistenzarzt in der unfallchirurgischen Abteilung des St. Elisabeth-Krankenhauses Neuwied.

